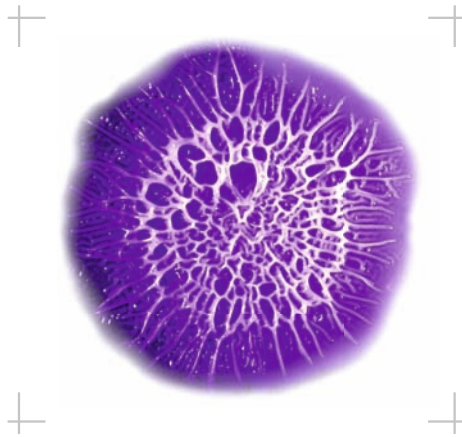


**INKA STOLLE**

---

Phänotypische und genotypische Charakterisierung von  
ESBL-/AmpC- $\beta$ -Laktamase- und Carbapenemase-bildenden  
*Escherichia coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten aus  
klinischem Untersuchungsgut von Haustieren



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. C. Ewers

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung  
von ESBL-/AmpC- $\beta$ -Laktamase- und Carbapenemase-  
bildenden *Escherichia coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten  
aus klinischem Untersuchungsgut von Haustieren**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

INKA STOLLE  
Tierärztin aus Salzgitter

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer
Gutachter:	Prof. Dr. C. Ewers
	Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 24.03.2017

Meiner Mutter

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation haben Eingang in folgende Veröffentlichungen gefunden:

---

### Originalartikel

- 1) **Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, Ch. (2013).** Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68(12):2802-08.

### Buchbeiträge

- 1) **Ewers, Ch., Stolle, I. (2016).** OXA-48-Carbapenemase in *Klebsiella*-Spezies und *Escherichia coli* bei Tieren. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, 2016; ISBN 978-3-9818383-0-5

### Vorträge

- 1) **Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, Ch. (2013).** Emergence of OXA-48 carbapenemase - producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. 5<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Gent, Belgium, 30. Juni - 03. Juli 2013.
- 2) **Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Pfeifer, Y., Ewers, Ch. (2014).** Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Tieren: Verbreitung und Bedeutung. Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Freising, 26.-28. Mai 2014.
- 3) **Ewers, Ch., Stamm, I., Scheufen, S., Leidner, U., Prenger-Berninghoff, E., Semmler, T., Stolle, I. (2015).** Human epidemic IncL/M type OXA-48 plasmid in different *Enterobacter cloacae* clones from dogs and cats. 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2015), 29 June - 1 July 2015, Tours, Frankreich.

### Posterpräsentationen

- 1) **Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, Ch. (2013).** OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples of dogs in Germany. FEMS, 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologist, Leipzig, 21.-25. Juli 2013.
- 2) **Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, Ch. (2013).** OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized dogs in Germany. 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Rostock, 22.-25. September 2013. Abstract in International Journal of Medical Microbiology, 303S1, S. 84 (NIP04)

# Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>I Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
<b>1. <math>\beta</math>-Laktam-Antibiotika .....</b>	<b>3</b>
1.1 Cephalosporine und Cephamycine.....	3
1.2 Carbapeneme .....	4
<b>2. Mechanismen der Resistenz von Enterobacteriaceae gegenüber</b>	
<b><math>\beta</math>-Laktam-Antibiotika .....</b>	<b>5</b>
2.1 $\beta$ -Laktamasen mit schmalen Wirkungsspektrum .....	6
2.2 Einteilung der $\beta$ -Laktamasen.....	6
2.3 $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum.....	8
<b>3. Plasmidtypen bei Carbapenemase-produzierenden Enterobacteriaceae ..</b>	<b>17</b>
<b>4. <i>E. coli</i> und <i>Klebsiella</i> spp.: Häufige ESBL-/AmpC-Bildner .....</b>	<b>19</b>
4.1 <i>E. coli</i> : Infektionsmedizinische Bedeutung und Einteilung in .....	
phylogenetische Gruppen und Pathotypen.....	19
4.2 <i>Klebsiella</i> spp.: Infektionsmedizinische Bedeutung .....	23
<b>5. Multilokus-Sequenztypen ESBL-/AmpC- und Carbapenemase-bildender</b>	
<b><i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate .....</b>	<b>24</b>
5.1 Multilokus-Sequenztypen ESBL- und Carbapenemase-bildender	
<i>E. coli</i> -Isolate .....	24
5.2 Multilokus-Sequenztypen ESBL- und Carbapenemase bildender	
<i>K. pneumoniae</i> -Isolate .....	26
<b>III Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Material .....</b>	<b>28</b>
1.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer .....	28
1.2 Verwendete Computerprogramme .....	28
1.3 Herkunft der <i>E. coli</i> - und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate .....	28
1.4 Verwendete Kontroll- und Referenzstämme .....	29
<b>2. Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1 Phänotypische Charakterisierung.....	29
2.2 Asservierung der Isolate.....	33
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	33
2.4 Untersuchungen zur Biofilmbildung bei Carbapenemase-Bildnern .....	47
2.5 Statistische Auswertungen .....	48
<b>IV Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>

<b>1.</b>	<b>Herkunft der <i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate .....</b>	<b>50</b>
1.1	Herkunft der <i>E. coli</i> -Isolate .....	50
1.2	Herkunft der <i>Klebsiella</i> spp.- Isolate .....	51
<b>2.</b>	<b>ESBL- und AmpC-bildende <i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate .....</b>	<b>52</b>
2.1	Phänotypische Charakterisierung.....	52
2.2	Genotypische Charakterisierung .....	57
2.3	Phylogenetische Untersuchungen.....	67
<b>3.</b>	<b>Carbapenemase-produzierende <i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate.....</b>	<b>75</b>
3.1	Phänotypische Charakterisierung.....	75
3.2	Genotypische Charakterisierung .....	82
3.3	Untersuchungen zur Phylogenie und Klonalität mittels MLST und Pulsfeldgelelektrophorese .....	88
3.4	Charakterisierung des OXA-48-Plasmids .....	91
3.5	Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Fähigkeit der Biofilmbildung.....	94
<b>V</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
<b>1.</b>	<b>Aufbau der Studie .....</b>	<b>101</b>
<b>2.</b>	<b>ESBL-/AmpC-bildende <i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate.....</b>	<b>102</b>
2.1	Relatives Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender <i>E. coli</i> und <i>Klebsiella</i> spp. Isolate .....	102
2.2	Verteilung und Verbreitung der <i>bla</i> -Gene .....	109
2.3	Pathotypen bei ESBL-/AmpC-bildenden <i>E. coli</i> .....	112
2.4	Vorkommen plasmidkodierter Fluorchinolonresistenzgene („PMQR“) bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen <i>E. coli</i> und <i>Klebsiella</i> spp. ....	118
<b>3.</b>	<b>Carbapenemase-produzierende <i>E. coli</i>- und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate.....</b>	<b>120</b>
3.1	Nachweis von OXA-48-bildenden Enterobacteriaceae bei Tieren .....	120
3.2	Hinweise auf eine nosokomiale Ausbreitung von Carbapenemase-produzierenden <i>E. coli</i> - und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten ...	122
3.3	Ursprung der OXA-48-Bildner – exogen vs. endogen.....	126
3.4	OXA-48-Bildner bei Tieren – Infektion vs. Kolonisation .....	129
3.5	Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung von <i>E. coli</i> und <i>K. pneumoniae</i> .....	131
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>134</b>
<b>VII</b>	<b>Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>IX</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>159</b>
<b>X</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>182</b>
<b>XI</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>183</b>



# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Abt.	Abteilung
A. dest	Aqua destillata
A/E-Läsionen	Attaching and Effacing-Läsionen
<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
AMC	Amoxicillin-Clavulansäure
AMI	Amikacin
AMP	Ampicillin
AmpC	AmpC- $\beta$ -Laktamase(n)
ATCC	American Type Culture Collection
B	Belgien
BAP	Blutagarplatte
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	engl.: brain heart infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ca.	Ca.
CC	Klonaler Komplex (engl.: Clonal Complex)
CFD	Cefpodoxim
CFP	Cefpirom
CFT	Ceftiofur
CHL	Chloramphenicol
CHN	China
CTZ	Ceftazidim
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CS	Clavulansäure
CZ	Tschechische Republik
DK	Dänemark
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECOR	engl.: <i>E. coli</i> reference
EDTA	Ethylendiamin-Tetraazetat-Natriumsalz
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ENR	Enrofloxacin
ESBL	Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamase(n)
ESP	EDTA-Sarcosyl-Proteinase K
EU	Europäische Union
ExPEC	Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
FQ	engl: Fluorquinolone
GEN	Gentamicin
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IST	Intensivtherapiestation
i. d. R	in der Regel

Abkürzung	Begriff
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
IMI	Imipenem
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Inc-Gruppe	Inkompatibilitätsgruppe (engl.: incompatibility)
InPEC	Intestinal pathogene <i>E. coli</i>
IRL	Irland
IST	Intensivtherapiestation(en)
J	Japan
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
KV	Kristallviolett
LB	engl.: lysogeny broth
MBL	Metallo-β-Laktamase(n)
MBX	Marbofloxacin
MDT	Magen-Darm-Trakt
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MHT	Modified Hodge Test
min	Minute
MLST	Multilokus Sequenztypisierung
MP-PCR	Multiplex-PCR
MRGN	multiresistente gramnegative Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTP	Mikrotiterplatte
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBI	Nährbouillon-I
NI	Nosokomiale Infektion(en)
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTF	Nitrofurantoin
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
o.g.	oben genannt
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penicillin-bindendes-Protein
PBRT	engl.: PCR based replicon typing
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PCV	engl.: plasmid-cured variant(s)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese

<b>Abkürzung</b>	<b>Begriff</b>
PIP	Piperacillin
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
pmol	Pikomolar
PMQR	Plasmid mediated quinolone resistance
RKI	Robert-Koch Institut
rpm	engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
sec	Sekunde
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SK	Slowakei
SLV	Single-locus-Variante
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
ssp	Subspezies
ST	Sequenztyp(en)
SXT	Trimethoprim-Sulfonamid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	Tetracyclin
TK	Transkonjugante(n)
TOB	Tobramycin
TZB	Tazobactam
U	engl.: unit
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VAG	Virulenzassoziertes Gen
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp(en)



# I Einleitung

Seit Beginn des neuen Jahrtausends ist das Vorkommen von Antibiotika-resistenten Enterobacteriaceae in der Humanmedizin vor allem im klinischen aber auch im ambulanten Bereich stark angestiegen [1, 2].

Eine der wichtigsten Ursachen für diese Problematik ist die Bildung von Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL), die dazu führt, dass fast alle  $\beta$ -Laktamantibiotika außer der Cephamycine und der Carbapeneme von dem Bakterium verstoffwechselt und deaktiviert werden können [3, 4]. Diese Enzyme werden am häufigsten in *Klebsiella (K.) pneumoniae* und *Escherichia (E.) coli* nachgewiesen, die unter anderem durch den Erwerb einer Vielzahl an virulenzassoziierten Genen (VAG) eine große Bedeutung als Ursache von lokalen und systemischen Infektionen bei Mensch und Tier haben [2, 5, 6]. Durch die Lokalisation der ESBL-kodierenden Gene auf Plasmiden ergibt sich eine schnelle Verbreitungsmöglichkeit dieser Resistenzmechanismen innerhalb der Bakterienpopulationen und durch das oftmals zusätzliche Vorhandensein von Resistenzgenen anderer Antibiotikaklassen (z. B. Fluorchinolone oder Aminoglykoside) auf dem ESBL-Plasmid kommt es häufig zu der Ausprägung eines multiresistenten Phänotyps [7, 8]. In diesem Fall kann bei Therapieversuchen nur noch auf wenige Antibiotikaklassen ausgewichen werden. In der Humanmedizin ist die ESBL vom CTX-M-15-Typ weltweit derzeit am weitesten verbreitet, was unter anderem in einem engen Zusammenhang mit der rasanten klonalen Verbreitung eines extraintestinalen Infektionen auslösenden hochvirulenten *E. coli* vom Sequenztyp (ST) 131 steht [9, 10]. Als Reaktion auf das erhöhte Vorkommen von ESBL-Bildnern wurden vermehrt Carbapeneme zur Therapie eingesetzt, was im Gegenzug zu einer Zunahme von Carbapenemase-bildenden Enterobacteriaceae führte [11]. Besonders im klinischen aber auch im ambulanten Bereich sind sie als Auslöser von nosokomialen Infektionen (NI) gefürchtet und in den Fokus der Forschung gerückt. Es kam bereits zu mehreren Ausbrüchen mit hauptsächlich Carbapenemase-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten sowohl in Kliniken in Deutschland als auch in anderen Ländern, die zum Teil aufgrund der fehlenden Therapieoptionen mit einer sehr hohen Mortalität einhergingen [11-14]. Der Anteil von Carbapenemase-Bildnern ist bei den Spezies *K. pneumoniae* und *E. coli* besonders hoch [15].

Auch bei Tieren nimmt die Zahl von ESBL-bildenden *E. coli* und *K. pneumoniae*-Isolaten seit dem erstmaligen Nachweis eines ESBL-bildenden *E. coli*-Isolats aus dem Urin eines Hundes im Jahr 1998 kontinuierlich zu. Sie werden sowohl bei Hobby- als auch bei Nutztieren gleichermaßen gefunden und schränken auch hier bei klinischen Infektionen die Therapieoptionen zum Teil stark ein [4, 16, 17]. Es gibt Hinweise dafür, dass eine Übertragung von ESBL-bildenden Enterobacteriaceae vom Tier auf den Menschen stattfindet. Da sie bei Lebensmittel-(LM)-liefernden Tieren häufig als Teil der physiologischen Darmmikrobiota nachgewiesen

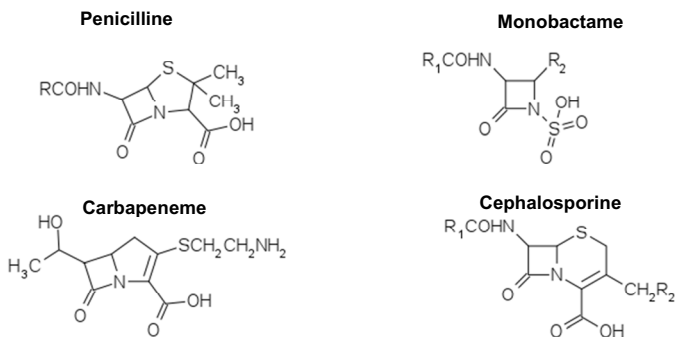
werden, besteht die Gefahr einer Kontamination von Lebensmitteln mit ESBL-Bildnern und somit einer indirekten Übertragung [18]. Besondere Bedeutung hat neben dem Übergang des gesamten Bakteriums die Übertragung von einzelnen Resistenzplasmiden und/oder -genen [19]. Dieser horizontale Gentransfer konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden [20, 21]. Welchen Anteil dieser Weg der Übertragung an dem Vorkommen von ESBL-Bildnern beim Menschen einnimmt, ist allerdings fraglich und kann derzeit noch nicht beziffert werden. Auch Carbapenemase-Bildner wurden in den letzten Jahren vereinzelt sowohl bei Nutz- als auch bei Hobbytieren nachgewiesen [22-25]. Diese Funde sind auch im Hinblick auf ein eventuell vorhandenes zoonotisches Potential alarmierend. Carbapeneme sind aufgrund der Relevanz für die Humanmedizin nicht zum therapeutischen Einsatz in der Veterinärmedizin zugelassen, wodurch sich Fragen nach der Entstehung von Carbapenemasen und auch zum Selektionsdruck ergeben.

Diese Arbeit soll einen Überblick über die aktuelle Verbreitung ESBL- und Carbapenemase-bildender *E. coli* und *Klebsiella* spp.-Isolate in diagnostischem Untersuchungsmaterial von Hobby- und Nutztieren geben. Zugleich soll durch die Typisierung von beteiligten Resistenzgenen und -plasmiden und durch die Bestimmung der phylogenetischen Gruppen und der Sequenztypen ein Vergleich zu der Humanmedizin ermöglicht und eventuell vorhandene Parallelen aufgedeckt werden. Außerdem soll geklärt werden, inwieweit bekannte humane Klone und im Falle von *E. coli* auch bestimmte Pathotypen an der Verbreitung von ESBL- und Carbapenemase-bildenden Isolaten bei Tieren beteiligt sind. Schließlich soll geklärt werden, inwieweit Resistenzplasmide einen Einfluss auf die Biofilmbildung des Bakteriums haben, um somit neben der Resistenz einen weiteren Selektionsvorteil von Resistenzplasmiden identifizieren zu können.

## II Literaturübersicht

### 1. $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Die Klasse der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika umfasst vier Gruppen: die Penicilline, die Cephalosporine und Cephamycine, die Carbapeneme und die Monobactame. Allen Gruppen gemeinsam ist der  $\beta$ -Laktamring in der Grundstruktur, der das antibakteriell aktive Zentrum darstellt [26]. Der  $\beta$ -Laktamring acetyliert unter Freisetzung von Penicilloinsäure bakterielle Transpeptidasen und andere Enzyme („Penicillin-bindende-Proteine“ (PBPs)), die am letzten Schritt der Peptidoglycansynthese beteiligt sind. Dadurch wird der Aufbau der Mureinschicht innerhalb der bakteriellen Zellwand inhibiert, womit die Stabilität der Bakterienzelle nicht mehr gegeben ist und es zu einem osmotisch bedingten Zelltod kommt [27]. Aufgrund der besonderen Relevanz für diese Arbeit sollen in den folgenden Kapiteln die Cephalosporine und die Carbapeneme näher erläutert werden.



**Abbildung 1 Grundgerüst der einzelnen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Gruppen**  
Eigene Darstellung

#### 1.1 Cephalosporine und Cephamycine

Cephalosporine kommen natürlicherweise im Schimmelpilz *Acremonium chrysogenum* als 7-Aminocephalosporansäure, die als Ausgangssubstanz für halbsynthetische Formen dient, vor. Der  $\beta$ -Laktamring ist hierbei im Gegensatz zu dem der Penicilline an einen fünfgliedrigen an einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring gebunden, was eine höhere Stabilität gegenüber bakteriellen  $\beta$ -Laktamasen bewirkt. Die Cephalosporine zeichnen sich zudem durch ein im Vergleich zu den Penicillinen breiteres Wirkspektrum aus. Es umfasst neben den grampositiven Bakterien in Abhängigkeit von der Substanz auch die gramnegativen Bak-

terien, was hauptsächlich einem besseren Durchdringen der gramnegativen Zellwand zuzuschreiben ist [28].

Eine gängige wenn auch nicht einheitlich definierte Einteilung der Cephalosporine erfolgt in Generationen. Bei der ersten Generation, zu der u. a. das Cefalexin gehört, handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Aminopenicilline im Hinblick auf das Erregerspektrum und vor allem der  $\beta$ -Laktamase-Stabilität [28]. Die zweite Generation, die in der Veterinärmedizin keine Anwendung findet, weist eine stärkere Wirksamkeit im gramnegativen Bereich auf, wohingegen die dritte Generation (u. a. Ceftiofur und Cefovecin) ein breites Spektrum sowohl grampositiver als auch gramnegativer Erreger abdeckt. Die vierte Generation, zu der auch das Cefquinom gehört, zeichnet sich zudem durch eine noch höhere  $\beta$ -Laktamase-Stabilität aus [27]. Die in der Veterinärmedizin zugelassenen Cephalosporine der neueren Generationen (Cefquinom, Ceftiofur, Cefovecin) besitzen keine Zulassung für die Humanmedizin. Gleichzeitig besitzen die neuesten Cephalosporine der 5. Generation (Ceftarolin, Ceftobiprol), deren Wirkspektrum auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) umfasst, eine ausschließliche Zulassung für die Humanmedizin [29].

Die Cephamycine stellen eine weitere Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika dar. Da sie den Cephalosporinen sehr ähnlich sind, werden sie allerdings häufig als solche klassifiziert. Sie besitzen ein ähnliches Substratspektrum wie die Cephalosporine der zweiten Generation, werden jedoch im Unterschied ursprünglich von *Streptomyces* spp. gebildet und besitzen an der siebten Position des Cephalosporingerüsts eine zusätzliche Methoxygruppe. Die  $\beta$ -Laktamase-Stabilität ist im Vergleich zu den Cephalosporinen deutlich höher [28].

## 1.2 Carbapeneme

Bei den Carbapenemen handelt es sich um Derivate von *Streptomyces* spp. Das Grundgerüst ist dem der Penicilline sehr ähnlich- ein Kohlenstoffatom anstelle des Schwefelatoms in dem dem  $\beta$ -Laktam-Ring angegliederten fünfgliedrigen Dihydrothiazinring unterscheidet sie voneinander und ist namensgebend (Abbildung 1). Die Carbapeneme, zu denen u. a. das in Deutschland im Jahr 1985 zugelassene Imipenem, das 1995 zugelassene Meropenem und das im Jahr 2002 zugelassene Ertapenem gehören, besitzen eine hohe Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien inklusive der Anaerobier und sind zugleich gegen viele  $\beta$ -Laktamasen unempfindlich [28]. Sie sind von der World Health Organization (WHO) als „critically important“ Antibiotika klassifiziert [30]. Das bedeutet, dass ihr Einsatz zum einen häufig die einzige oder eine der wenigen therapeutischen Optionen von schwerwiegenden Infektionskrankheiten beim Menschen darstellt und sie zum anderen bei der Behandlung von Bakterien, die einen nicht-humanen Ursprung haben oder deren Resistenzgene einen nicht-humanen Ursprung besitzen, eine essentielle Rolle einnehmen [30]. Aus dieser Gruppe sind keine Substanzen für den Gebrauch in der Veterinär-



medizin zugelassen. Es kann jedoch bei Kleintieren und Pferden, die nicht als LM-liefernde Tiere gelten, bei Therapienotstand eine Umwidmung nach AMG § 56a Absatz 2 erfolgen.

## 2. Mechanismen der Resistenz von Enterobacteriaceae gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Die Familie der Enterobacteriaceae gehört zu den fakultativ anaeroben gramnegativen Stäbchenbakterien. Die einheitliche Grundstruktur ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein des typischen Lipopolysaccharids (LPS) in der äußeren Membran, dessen Bestandteil Lipid A als Endotoxin bezeichnet wird. Der Darm stellt das natürliche Habitat der Familie dar. Außerhalb dieses Habitats sind sie häufig an extraintestinalen Infektionen wie Wund- oder Harnwegsinfektionen beteiligt. Dennoch können einige Gattungen wie z. B. *E. coli*, *Yersinia* spp. oder *Salmonella* spp. auch schwere intestinale Infektionen hervorrufen [31]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden innerhalb dieser Familie vermehrt Resistenzen, das heißt eine natürliche oder meist erworbene Nichtempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen, bekannt. Es gibt drei wichtige Mechanismen, die bei Enterobacteriaceae zu einer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika führen können [28, 32]:

- **Strukturelle Veränderungen der Penicillin-bindenden Proteine (PBPs)**

Diese Veränderungen sind chromosomal bedingt und führen dazu, dass PBPs gebildet werden, die keine oder nur eine geringe Affinität zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika besitzen. Diesen Resistenzmechanismus findet man vor allem bei grampositiven Bakterien und seltener bei den Enterobacteriaceae.

- **Strukturelle Veränderungen der Zellwand**

Eine verminderte Produktion von Porinen und/oder eine vermehrte Ausschleusung der Antibiotika aus dem periplasmatischen Raum durch Efflux-Pumpen (v. a. bei *Enterobacter* spp.) können ebenfalls zu einer klinischen Resistenz führen. Da vor allem die Cephalosporine die Porine nutzen, um die Zellwand gramnegativer Erreger zu durchdringen, bewirkt dieser Resistenzmechanismus in erster Linie eine Resistenz gegenüber dieser Gruppe.

- **Bildung von  $\beta$ -Laktamasen**

Die Bildung von Enzymen, die den  $\beta$ -Laktamring spalten und somit je nach Art sowohl Penicilline, Cephalosporine als auch Carbapeneme inaktivieren können, stellt den wichtigsten und häufigsten Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien dar. Er unterliegt einer ständigen Anpassung an den u. a. durch Antibiotikagebrauch geschaffenen Selektionsdruck.

## 2.1 $\beta$ -Laktamasen mit schmalem Wirkspektrum

Viele gramnegative Bakterien besitzen von Natur aus chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamasen, die in der Lage sind, Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation zu verstoffwechseln [33]. Die Produktion erfolgt entweder konstitutiv, das heißt, die Enzyme werden unabhängig von äußeren Einflüssen jederzeit in bestimmten Mengen produziert, oder sie ist induzierbar. In diesem Fall wird die Bildung der  $\beta$ -Laktamasen als Reaktion auf äußere Umwelteinflüsse (z. B. Einsatz antimikrobieller Substanzen) vorübergehend hochreguliert. Im Allgemeinen ist die dabei produzierte Menge allerdings zu gering, als dass es zu einer therapeutischen Resistenz kommen könnte [34]. Kann ein Bakterium durch die normalerweise im Gewebe maximal erreichbaren Konzentrationen eines antimikrobiell wirksamen Wirkstoffes nicht mehr gehemmt werden, ist es therapeutisch resistent. „Resistenz“ wird in Anlehnung an die von der CLSI oder EUCAST verfügbaren Grenzwerte definiert [35, 36].

Neben den chromosomal kodierten  $\beta$ -Laktamasen ist mittlerweile eine Vielzahl an plasmidkodierten Varianten bekannt. Sie wurden zum größten Teil aus chromosomal kodierten  $\beta$ -Laktamasen mobilisiert [37] und erleichtern eine Verbreitung der Resistenz sowohl inter- als auch intraspezifisch [38]. Die wichtigsten plasmidkodierten  $\beta$ -Laktamasen mit schmalem Wirkspektrum bei Enterobacteriaceae sind neben der am häufigsten vorkommenden TEM-1 die Enzyme SHV-1, OXA-1 und TEM-2 [32, 39]. Neben den  $\beta$ -Laktamasen mit schmalem Spektrum existieren auch solche mit einem breiten Spektrum, das die Cephalosporine der 3. und 4. Generation mit einschließt (s. 2.3).

## 2.2 Einteilung der $\beta$ -Laktamasen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten  $\beta$ -Laktamasen einzuteilen. Zwei gängige Klassifizierungssysteme sind dabei das molekulare Klassifizierungssystem nach Ambler [40] und das funktionale Klassifizierungssystem nach Bush, Jacoby und Medeiros [41] (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Klassifikationsschema für bakterielle  $\beta$ -Laktamasen, modifiziert nach Bush und Jacoby [42]**

Bush-Jacoby-Gruppe (2010)	Ambler Gruppe (1980)	Bevorzugstes Substrat	Hemmung durch		Definition
			CS oder TZB	EDTA <sup>c</sup>	
1	C	Cephalosporine	Nein	Nein	Bessere Hydrolyse von Cephalosporinen als von Benzylpenicillinen; hydrolysieren Cephamycine
1e	C	Cephalosporine	Nein	Nein	Erhöhte Hydrolyse von CTZ und oftmals anderen Oxyimino- $\beta$ -Laktamen
2a	A	Penicilline	Ja	Nein	Bessere Hydrolyse von Benzylpenicillin als von Cephalosporinen
2b	A	Penicilline; Cephalosporine der 1. & 2. Generation	Ja	Nein	Ähnliche Hydrolyse von Benzylpenicillin und Cephalosporinen
2be	A	ES-Cephalosporine, Monobactame	Ja	Nein	Erhöhte Hydrolyse von Oxyimino- $\beta$ -Laktamen
2br	A	Penicilline	Nein	Nein	Resistenz gegenüber CS, Sulbactam und TZB
2ber	A	ES-Cephalosporine, Monobactame	Nein	Nein	Erhöhte Hydrolyse von Oxyimino- $\beta$ -Laktamen, kombiniert mit Resistenzen gegenüber CS, TZB, Sulbactam
2d	D	Cloxacillin	Variabel	Nein	Erhöhte Hydrolyse von Oxacillin oder Cloxacillin
2de	D	ES-Cephalosporine	Variabel	Nein	Hydrolyse von Cloxacillin oder Oxacillin und Oxyimino- $\beta$ -Laktamen
2df	D	Carbapeneme	Variabel	Nein	Hydrolyse von Cloxacillin oder Oxacillin und Carbapenemen
2e	A	ES-Cephalosporine	Ja	Nein	Hydrolyse von Cephalosporinen, Hemmung durch CS
2f	A	Carbapeneme	Variabel	Nein	Erhöhte Hydrolyse von Carbapenemen, Oxyimino- $\beta$ -Laktamen, Cephamycinen
3a	B	Carbapeneme	Nein	Ja	Breitspektrum-Hydrolyse inklusive der Carbapeneme, jedoch nicht von Monobactamen
3b	B	Carbapeneme	Nein	Ja	Bevorzugte Hydrolyse von Carbapenemen

CS = Clavulansäure, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, ES = Extended-Spektrum, TZB = Tazobactam, CTZ= Cefprozidim

Die Einteilung nach Ambler basiert auf den Übereinstimmungen von Aminosäure (AS)-Sequenzen und teilt die  $\beta$ -Laktamasen in vier Gruppen (A-D) ein. Die Gruppen A, C und D umfassen die Serin- $\beta$ -Laktamasen, wohingegen die Gruppe B die  $\beta$ -Laktamasen beinhaltet, die ein Zinkion in ihrem aktiven Zentrum besitzen. Bei der Einteilung nach Bush (Gruppen 1-4) werden das Substratspektrum und die Hemmbarkeit der einzelnen  $\beta$ -Laktamasen, wie in Tabelle 1 dargestellt, berücksichtigt [41].

## 2.3 $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum

### 2.3.1 Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL) und AmpC- $\beta$ -Laktamasen (AmpC)

#### 2.3.1.1 Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL)

Als Reaktion auf das vermehrte Vorkommen von  $\beta$ -Laktamasen wurden in den 1980er Jahren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit einer erhöhten  $\beta$ -Laktamase-Stabilität entwickelt. Dazu gehörten u. a. die Cephalosporine [43]. Durch den häufigeren Einsatz dieser neuen antimikrobiellen Substanzgruppe und dem damit verbundenen Selektionsdruck kam es zu der Entstehung neuer Varianten der  $\beta$ -Laktamasen: den ESBL. Definitionsgemäß handelt es sich bei den ESBL um  $\beta$ -Laktamasen, die in der Lage sind, Oxyimino-Cephalosporine zu inaktivieren und die zudem durch  $\beta$ -Laktamase-Hemmer wie Clavulansäure inhibiert werden können [33]. Sie befinden sich in den Ambler-Gruppen A und D und wurden von Bush *et al.* (2010) der funktionalen Gruppe 2be zugeordnet (Tabelle 1). Carbapeneme und Cephamyne gehören nicht zu ihrem Spektrum [44]. ESBL sind z. T. ursprünglich aus den plasmidkodierten Varianten der  $\beta$ -Laktamasen TEM-1 oder TEM-2 und SHV-1 hervorgegangen. Durch Punktmutationen an einer oder mehreren Stellen des kodierenden Genabschnitts kam es zu einem AS-Austausch, der wiederum u. a. zu einer Vergrößerung des aktiven Zentrums der Enzyme und so zu einer Erweiterung des Substratspektrums geführt hat [37]. Bei einem anderen Teil der ESBL wie z. B. denen vom CTX-M-Typ handelt es sich um Enzyme, deren genetischer Ursprung in der Umwelt (z. B. in Pilzen oder pflanzenpathogenen Keimen) liegt. Sie wurden von verschiedenen Bakterienspezies wie *E. coli* und *K. pneumoniae* aufgenommen und haben sich v. a. durch Mutationen verändert [45].

ESBL werden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in der AS-Sequenz in verschiedene Familien eingeteilt. Die vier wichtigsten bei Enterobacteriaceae vorkommenden ESBL-Familien werden im Folgenden näher erläutert.

- **TEM**

TEM-1 wurde erstmals 1965 bei einem *E. coli*-Isolat von einer griechischen Patientin namens Temoneira nachgewiesen und ist genau wie TEM-2, die sich von TEM-1 in nur einer AS unterscheidet, nur in der Lage, Penicilline zu hydrolysieren [46]. Mittlerweile sind über 220 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016). verschiedene Enzyme aus dieser Familie bekannt. Bei der Mehrheit handelt es sich um ESBL, die Derivate von TEM-1 und TEM-2 darstellen. Die erste ESBL aus dieser Familie (TEM-3) wurde 1984 in Frankreich entdeckt [47]. Sie unterscheidet sich an zwei Stellen von der AS-Sequenz von TEM-2 [48] und kann neben Cephalosporinen auch Monobactame verstoffwechseln [49].

### • SHV

Der Name SHV steht für „sulfhydryl variable“ und bezieht sich auf strukturelle Eigenschaften der Enzyme. Die  $\beta$ -Laktamase SHV-1 (non-ESBL), die Resistenzen gegen Breitband-Penicilline vermittelt, wird häufig in *K. pneumoniae*-Isolaten nachgewiesen und kann hier sowohl plasmid- als auch chromosomal kodiert vorliegen [33]. Sie diente als phylogenetischer Ursprung für die weiteren Enzyme aus dieser Gruppe. Durch eine Mutation, die an der Position 238 zu einer Änderung der AS-Sequenz von SHV-1 führte, entstand die ESBL SHV-2, die erstmals 1983 in Deutschland in einem *K. ozaenae*-Isolat nachgewiesen werden konnte [50]. Mittlerweile sind innerhalb dieser Familie mehr als 190 verschiedene Typen bekannt (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016).

### • CTX-M

Die Familie der CTX-M  $\beta$ -Laktamasen wird aufgrund ihrer schnellen globalen Verbreitung und ihrer häufigen Beteiligung an NI seit mehr als zehn Jahren als die wichtigste ESBL-Familie angesehen [51, 52]. Im Gegensatz zu den oben genannten Familien handelt es sich bei allen Mitgliedern der CTX-M-Familie um ESBL [46]. Die Präferenz der Enzyme, Cefotaxim zu hydrolysieren und der Ort des erstmaligen Nachweises (München) waren hier namensgebend (Cefotaximase-Munich) [53].

CTX-M  $\beta$ -Laktamasen können anhand ihrer AS-Sequenz in fünf Gruppen klassifiziert werden. Die einzelnen Gruppen weisen dabei eine Ähnlichkeit von < 90 % zueinander auf, während sich die Mitglieder einer Gruppe zu 95 % oder mehr ähneln. Die natürlich in verschiedenen *Kluyvera* spp. vorkommenden Enzyme vom CTX-M-Typ gelten als Vorläufer für die Subgruppen CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 und CTX-M-25 [54]. Seit ihrer Entdeckung Anfang der 1990er Jahre [53] ist diese Familie stetig gewachsen und beherbergt bis zum heutigen Stand 182 verschiedene Typen (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016), deren Vorkommen sich über mehrere Kontinente verteilt.

### • OXA

Die Familie der OXA  $\beta$ -Laktamasen, die der Ambler Gruppe D zuzuordnen ist, ist sehr heterogen; sie stellt eher eine Zusammenführung verschiedener Enzyme aufgrund phänotypischer als auf genotypischer Übereinstimmungen dar. Einzelne Mitglieder besitzen dabei in ihrer AS-Sequenz nur eine Ähnlichkeit von 20 %. Sie weisen alle eine hohe Affinität zu Oxacillin und Cloxacillin auf, wodurch auch die Benennung erklärbar ist. Eine Hemmung durch Clavulansäure ist zudem nur schwer erreichbar [33]. Aufgrund dieser Eigenschaften ordneten Bush *et al.* (1995) die Mitglieder dieser Familie in die Subgruppe 2d ein (Tabelle 1) [41]. Nur bei wenigen Mitgliedern dieser Familie handelt es sich um ESBL

(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016). Sie kommen vorwiegend bei nicht-Enterobacteriaceae wie zum Beispiel *Pseudomonas (P.) aeruginosa* vor [33].

### 2.3.1.2 AmpC- $\beta$ -Laktamasen (AmpC)

Funktionell unterscheiden sich die AmpC von den ESBL in zwei wesentlichen Punkten. Zum einen schließt das erweiterte Substratspektrum zusätzlich zu den Oxyimino-Cephalosporinen auch die Cephamycine ein, zum anderen lassen sie sich nicht durch Inhibitoren wie Clavulansäure oder Tazobactam hemmen. Aufgrund dieser Eigenschaft erfolgte eine Eingruppierung von Bush *et al.* (1995) in die Gruppe 1 [41]. In dem molekularen Klassifizierungsschema nach Ambler finden sie sich in Gruppe C wieder (Tabelle 1) [40].

Viele Enterobacteriaceae wie *Enterobacter (E.) cloacae*, *Citrobacter (C.) freundii* und *Serratia (S.) marcescens* besitzen chromosomal kodierte AmpC, deren Expression induzierbar ist und die zu einer  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Resistenz führen kann. Andere Spezies hingegen wie z. B. *E. coli* besitzen eine konstitutiv produzierte chromosomal kodierte AmpC [55]. Hier kann es durch Mutationen im Promotor zu einer Hyperproduktion und somit zu einer Resistenz kommen. *Klebsiella* spp. und *Proteus (P.) mirabilis* sind Beispiele für Vertreter der Enterobacteriaceae, die kein chromosomales *ampC*-Gen besitzen [43].

Das erste plasmidkodierte *ampC*-Gen wurde in *K. pneumoniae*-Isolaten Anfang der 1990er Jahre entdeckt [56]. Durch die Ähnlichkeit von 90 % zu dem chromosomalen *ampC*-Gen von *E. cloacae* ist auch hier von einer Entstehung aus der chromosomalen Variante auszugehen. In Kombination mit Porinverlusten können plasmidkodierte AmpC sogar zu einer Resistenz gegenüber Carbapenemen führen [43].

Mittlerweile gibt es verschiedene plasmidkodierte AmpC-Familien, die weltweit verbreitet sind [43]. Die Familie der CMY (Cephamycinase)- $\beta$ -Laktamasen stellt dabei die größte Gruppe mit derzeit 139 Mitgliedern dar gefolgt von ACT („AmpC type“)- $\beta$ -Laktamasen (39 Mitglieder), DHA (Dhahan hospital in Saudi Arabia)- $\beta$ -Laktamasen (24 Mitglieder) und MIR (Miriam hospital in Providence)- $\beta$ -Laktamasen (18 Mitglieder) (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016).

### 2.3.1.3 ESBL/AmpC bei Enterobacteriaceae in der Humanmedizin

1983 wurde von Knothe *et al.* die Übertragbarkeit der Resistenz gegenüber neueren Cephalosporinen dreier *K. pneumoniae*-Isolate und eines *S. marcescens*-Isolats, die aus Patienten eines Frankfurter Krankenhauses isoliert werden konnten, mittels Transkonjugationsversuchen nachgewiesen [57]. Kliebe *et al.* wiesen bei einem ebenfalls aus dem Frankfurter Krankenhaus stammenden *K. ozaenae*-Isolat die ESBL SHV-2 nach [50]. 1984 folgte die Entdeckung der ersten ESBL aus der TEM-Familie (TEM-3) in Frankreich [47]. Weitere Berichte

über Nachweise von ESBL vom SHV- und TEM-Typ bei Enterobacteriaceae folgten in den darauffolgenden Jahren [58]. Mit Ausnahme von einem *K. pneumoniae*-Isolat aus Chile, bei dem die ESBL SHV-5 beschrieben wurde [59], beschränkten sich die Nachweise vorerst auf Europa. Eine weltweite Verbreitung der ESBL begann Anfang der 1990er Jahre, als es zu mehreren Ausbrüchen mit ESBL-produzierenden Enterobacteriaceae in den USA kam [60, 61]. Auch hier waren nur ESBL vom SHV- oder TEM-Typ beteiligt. Berichte über die erstmals 1989 entdeckte CTX-M-Familie [53] waren bis weit in die 1990er Jahre selten [51, 54]. Seit der Jahrtausendwende hat sich dieses Verhältnis jedoch deutlich zugunsten der CTX-M ESBL sowohl in Europa als auch in Ostasien und Südamerika verschoben. Allein in Nordamerika sind die TEM- und SHV-Varianten unter den nachgewiesenen ESBL weiterhin vorherrschend, wobei auch hier eine steigende Anzahl von Berichten darauf hindeuten, dass sich die CTX-M-bildenden Bakterien weiter verbreiten [62]. Während ESBL vom SHV- und TEM-Typ in den 1990er Jahren häufig mit an NI beteiligten *K. pneumoniae*-Isolaten assoziiert waren und seltener bei *E. coli* und anderen Enterobacteriaceae vorkamen, fand man die ESBL vom CTX-M-Typ häufiger in *E. coli*-Isolaten und diese zunehmend auch bei nicht hospitalisierten Personen [54].

Die Verbreitung und Häufigkeit der ESBL- und AmpC-Typen bei Menschen variiert in den einzelnen Kontinenten. In Asien und Amerika dominiert die ESBL CTX-M-15 gefolgt von CTX-M-14. Andere Typen wie z. B. CMY-2 oder CTX-M-27 und weitere machen insgesamt nur rund ein Viertel der nachgewiesenen ESBL/AmpC aus. Auch in Europa stellen CTX-M-15 und CTX-M-14 mit rund der Hälfte an den nachgewiesenen ESBL/AmpC die häufigsten ESBL-Typen dar. Die andere Hälfte ist sehr heterogen, neben weiteren ESBL vom CTX-M-Typ können auch CMY-2, SHV-12 und TEM-52 häufiger nachgewiesen werden [4].

#### **2.3.1.4 ESBL/AmpC bei Enterobacteriaceae in der Veterinärmedizin**

##### **Hobbytiere**

1988 berichteten Matsumoto *et al.* von einem Cefotaxim-resistenten *E. coli*-Stamm, der 1986 im Rahmen einer pharmakokinetischen Studie für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in Japan aus dem Kot eines Laborhundes isoliert werden konnte. Die als Ursache identifizierte  $\beta$ -Laktamase wurde als FEC-1 (Fujisawa *E. coli*) bezeichnet; Ende der 1990er Jahre durchgeführte Sequenzanalysen des kodierenden Gens zeigten jedoch eine große Ähnlichkeit zu der 1996 in Polen entdeckten ESBL CTX-M-3 [51].

Das erste klinische ESBL-produzierende Bakterium bei Tieren, ein SHV-12 bildender *E. coli*, wurde 1998 in Spanien von einem Hund mit chronischer Zystitis isoliert [63]. Wenige Jahre später folgten Berichte über ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* aus Portugal, die sowohl von gesunden als auch von Hunden mit Infektionen des Urogenitaltrakts stammten [64, 65]. Ne-

ben weiteren Berichten aus Europa [66, 67] gab es auch mehrere Veröffentlichungen über Nachweise von ESBL-produzierenden Enterobacteriaceae bei Heimtieren aus anderen Kontinenten wie Nordamerika [68, 69], Südamerika [70], Asien [71, 72] und Australien [73]. Die Verteilung der ESBL/AmpC ist eher heterogen; unter den hierbei nachgewiesenen ESBL dominiert wie in der Humanmedizin die CTX-M-Familie. CTX-M-15 stellt dabei in Europa neben CTX-M-1 den am häufigsten nachgewiesenen Typ dar, in anderen Gebieten dominiert CTX-M-14. Aber auch die ESBL TEM-52 und SHV-12 und die AmpC CMY-2 werden - wenn auch deutlich seltener - beim Hobbytier nachgewiesen [4, 74].

### **Nutztiere**

Aus dem Bereich der Nutztierhaltung gibt es zahlreiche Berichte über den Nachweis von ESBL-/AmpC-produzierenden Enterobacteriaceae. Den Anfang machten im Jahr 2000 Fey *et al.* in den USA mit einer Beschreibung von *bla*<sub>CMY-2</sub>-positiven Salmonellen aus dem Kot von Rindern [75]. Die ersten ESBL-/AmpC-produzierenden *E. coli* bei Nutztieren wurden nahezu zeitgleich sowohl in einer spanischen Studie im Zeitraum von 2000-2001 als auch in einer japanischen Studie zwischen 1999 und 2002 jeweils aus dem Kot von gesunden Hühnern isoliert [76, 77]. Beteiligte  $\beta$ -Laktamasen waren dabei CTX-M-14, CTX-M-2 und CMY-2. In den darauffolgenden Jahren folgten weltweit weitere Berichte über ESBL-/AmpC-produzierende Bakterien (meist *E. coli* und *Salmonella* spp.) bei gesunden als auch bei kranken LM-liefernden Tieren. Betroffen waren dabei neben Rindern und Geflügel auch Schweine, Pferde und Kaninchen [78]. Derzeit stellt CTX-M-1 die bei Nutztieren am häufigsten nachgewiesene ESBL dar [4, 79], aber auch TEM-52 und SHV-12 sowie CMY-2 als häufigste AmpC kommen häufiger beim Nutztier vor [80, 81].

### **2.3.2 Carbapenemasen**

Seit Anfang der 2000er Jahre wurde als Reaktion auf das vermehrte Vorkommen von ESBL-/AmpC-bildenden Bakterien der weltweite Einsatz der Carbapeneme in der Humanmedizin stark erhöht (von 2000 bis 2010 um 45 %) [82]. Auch in Deutschland ist der Einsatz von  $< 1 \times 10^5$  Standard units (single dose units) im Jahr 2000 auf  $> 1 \times 10^7$  im Jahr 2010 gestiegen [82]. In einigen europäischen Ländern wie z. B. Dänemark oder Luxemburg ist der Verbrauch von Carbapenemen im Krankenhausbereich um mehr als 50 % gestiegen [83]. Auch im ambulanten Bereich hat sich der Einsatz von Carbapenemen in den letzten Jahren in einigen europäischen Ländern wie z. B. Deutschland oder Frankreich signifikant erhöht [84]. Vor allem bei den Enterobacteriaceae kam es in den letzten Jahren vermehrt zu Resistenzen gegenüber Carbapenemen vermittelt durch Carbapenemasen. Dieses Phänomen könnte aufgrund der chronologischen Gegebenheiten als Antwort auf den gesteigerten Selektionsdruck interpretiert werden [85]. Carbapenemasen unterscheiden sich von den ESBL/AmpC zum



einen in dem Substratspektrum, das meist neben den namensgebenden Carbapenemen auch alle anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika einschließt, und zum anderen in der Hemmbarkeit durch ausgewählte  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren [85]. Die Ausprägung dieser beiden Faktoren ist abhängig von der jeweiligen Eingruppierung der einzelnen Carbapenemase-Typen in das Schema nach Ambler. Die Carbapenemasen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar und sind sowohl in den Ambler Gruppen A und B als auch in D zu finden (Tabelle 1).

- **Carbapenemasen aus der Ambler Gruppe A**

Die Carbapenemasen aus der Ambler Gruppe A besitzen ein breites Substratspektrum, das alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotikaklassen einschließt. Sie können *in vitro* durch Clavulansäure und Tazobactam gehemmt werden und wurden somit von Bush *et al.* in die Gruppe 2f eingruppiert [42]. Dazu zählen zum einen die meist chromosomal kodierten Carbapenemasen NmCA (non-metallo-carbapenemase A), IMI (imipenemase) und SME (*S. marcescens* enzyme), die sporadisch in *Enterobacter* spp.- und *S. marcescens*-Isolaten gefunden wurden, und seltene Varianten aus der ursprünglich als reine ESBL-Familie deklarierten GES (Guiana extended-spectrum)-Familie [11]. Am meisten verbreitet und klinisch am bedeutendsten sind jedoch die plasmidkodierten KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase)-Enzyme mit aktuell 24 Varianten (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016), die jedoch nicht nur bei *K. pneumoniae* sondern z. B. auch bei *P. aeruginosa* oder *E. cloacae* vorkommen können [86]. Sie wurden 1996 erstmals in den USA entdeckt und sind mittlerweile weltweit verbreitet [11].

- **Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBL) aus der Ambler Gruppe B**

Auch innerhalb der MBL gibt es chromosomal- und plasmidkodierte Varianten, wobei Erstere aufgrund der Vielzahl an plasmidkodierten Varianten von geringerer Bedeutung sind. Bei den weltweit verbreiteten Carbapenemase-Familien IMP (active on Imipenem), VIM (Verona integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase) und NDM (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase) handelt es sich i. d. R. um plasmidkodierte MBL [11]. Sie ähneln sich in ihrem Substratspektrum, das alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit Ausnahme der Monobactame umfasst. Die Mitglieder dieser Gruppe können aufgrund des Zinkions in ihrem aktiven Zentrum nicht durch bekannte  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, dafür jedoch durch EDTA gehemmt werden, was eine Eingruppierung in die Gruppe 3a in dem Schema nach Bush bewirkte (Tabelle 1) [42]. Die Enzyme vom NDM-Typ konnten bisher hauptsächlich bei Enterobacteriaceae gefunden werden, VIM-Enzyme kommen dahingegen neben Enterobacteriaceae vermehrt bei anderen gramnegativen Erregern wie z. B. *P. aeruginosa* vor [11].

- **Carbapenemasen vom OXA-Typ (Ambler Gruppe D)**

Bei ca. 130 der derzeit 518 Mitglieder der heterogenen OXA-Familie (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, Stand November 2016) handelt es sich gesichert um Carbapenemasen. Diese besitzen meist nur eine schwache Aktivität gegenüber Carbapenemen als auch gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation und können weder durch Clavulansäure noch durch EDTA dafür aber durch NaCl gehemmt werden [11]. Die Carbapenemasen vom OXA-Typ liegen häufig chromosomal kodiert vor und werden auf der Basis ihrer AS-Sequenz in neun Untergruppen unterteilt. Die einzelnen Gruppen sind sich zu 40-70 %, einzelne Gruppenmitglieder untereinander mindestens zu 92,5 % in ihrer AS-Sequenz ähnlich.

Die Mehrheit der OXA-Typ-Carbapenemasen konnte bisher in *Acinetobacter* (A.) spp. (hauptsächlich *A. baumannii*) gefunden werden. Dazu zählen die am häufigsten bei dieser Gattung nachgewiesenen plasmidkodierten Enzyme OXA-23 und OXA-58, aber auch das chromosomal kodierte OXA-51, das in Verbindung mit einem dem *bla*<sub>OXA-51</sub>-Gen vorgeschalteten Insertionselement eine gewisse hydrolytische Aktivität gegenüber Carbapenemen vermitteln kann [87].

OXA-48 und seine Derivate konnten dahingegen bisher nur bei Enterobacteriaceae nachgewiesen werden [11]. Es sind mittlerweile sechs Derivate (OXA-4, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 und OXA-232) bekannt, die sich in höchstens vier AS von OXA-48 unterscheiden [88]. Bei den Carbapenemasen vom OXA-48-Typ, die ihren Ursprung im Chromosom des nicht humanpathogenen Bakteriums *Shewanella oneidensis* haben [89], handelt es sich neben OXA-23 und OXA-58 um eine der wenigen plasmidkodierten Varianten der OXA-Carbapenemasen.

### **2.3.2.1 Carbapenemasen bei Enterobacteriaceae in der Humanmedizin**

Noch bevor Carbapeneme für die Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten zugelassen wurden, konnten in den 1980er Jahren bereits vereinzelt chromosomal kodierte Carbapenemasen wie z. B. IMI-1 bei Enterobacteriaceae sowohl in Europa als auch in den USA nachgewiesen werden [90, 91]. 1995 erfolgte der erste Bericht über mehrere 1993 in Japan isolierte klinische *S. marcescens*-Isolate, die eine erworbene Carbapenemase (IMP-1) besaßen [92]. Seitdem konnten MBL weltweit nicht nur in *E. coli* und *Klebsiella* spp. und in anderen Enterobacteriaceae sondern z. B. auch in Pseudomonaden nachgewiesen werden [93].

Das erste Mitglied der weltweit bei den Enterobacteriaceae am weitesten verbreiteten und vorrangig im Zusammenhang mit systemischen Infektionen beschriebenen KPC-Familie konnte 1996 in einem *K. pneumoniae*-Isolat im Osten der USA gefunden werden [94]. Nach einer Ausbreitung über den ganzen nordamerikanischen Kontinent wurden Ausbrüche mit

KPC-produzierenden Bakterien auch in vielen anderen Ländern beobachtet. In Europa handelt es sich v. a. bei Italien und Griechenland um endemische Gebiete [85]. Im Jahre 2008 in Deutschland erstmals nachgewiesen, handelt es sich bei KPC-2 um die nach OXA-48 am zweithäufigsten bei uns nachgewiesene Carbapenemase bei Enterobacteriaceae, die bereits mit mehreren nosokomialen Ausbrüchen assoziiert war [12, 15]. Auch KPC-3 wird in Deutschland nachgewiesen. Bei beiden Carbapenemasen gibt es Hinweise auf ein endemisches Vorkommen in Sachsen, das vermutlich mit einem Ausbruch KPC-2-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate im Universitätsklinikum Leipzig in den Jahren 2010-2013, bei dem insgesamt 103 Patienten mit dem Erreger infiziert bzw. kolonisiert wurden, im Zusammenhang steht [95].

2003 wurde erstmals in der Türkei eine Carbapenemase vom OXA-48-Typ in einem *K. pneumoniae*-Isolat nachgewiesen [89]. Von der Türkei ausgehend hat seitdem eine Ausbreitung dieser Carbapenemase über den mediterranen Raum bis nach Westeuropa stattgefunden, wobei neben vielen beschriebenen Einzelfällen auch mehrere Ausbrüche u. a. in Frankreich, Belgien, den Niederlanden und Spanien zu verzeichnen sind [3, 13, 14, 96, 97]. In Deutschland werden Carbapenemasen vom OXA-48-Typ derzeit am häufigsten nachgewiesen. Von 2677 zur Untersuchung auf Carbapenemasen an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger eingesandten Enterobacteriaceae-Isolaten besaßen 331 die Carbapenemase OXA-48. Bei 235 Isolaten handelte es sich dabei um die Spezies *K. pneumoniae*. Insgesamt ist die Tendenz der Nachweise von OXA-48 seit der Einrichtung des NRZ im Jahr 2009 stetig steigend [15]. Auch in einer Studie von Kaase *et al.* wurde unter 45 Carbapenem-unempfindlichen *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolaten am häufigsten OXA-48 (n=14) nachgewiesen, wobei nur zwei Isolate denselben Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)-Typ aufwiesen [98].

Seit ihrem erstmaligen Nachweis im Jahr 2008 stehen auch Carbapenemasen vom NDM-1-Typ im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Es liegt häufig eine Verbindung zum indischen Subkontinent bei infizierten oder kolonisierten Patienten vor, was darauf hinweist, dass dieser ein Reservoir für *bla*<sub>NDM-1</sub> darstellt [11]. Eine weitere bedeutende Quelle wird derzeit im mittleren Osten und in den Balkanstaaten gesehen [93]. Seit der Entdeckung im Jahr 2008 hat eine schnelle und weltweite Verbreitung (mit Aussparung des südamerikanischen Kontinents) dieser Carbapenemase stattgefunden [88]. In Deutschland war NDM-1 im Jahr 2014 die am vierthäufigsten nachgewiesene Carbapenemase bei den Enterobacteriaceae. Mit 162 im NRZ für gramnegative Krankenhauserreger positiv für NDM-1 getesteten Isolaten konnte eine deutlich steigende Tendenz zum Vorjahr (2013: 110 positiv getestete Isolate) beobachtet werden. Insgesamt handelt es sich bei NDM-1 um die derzeit in Europa am wenigsten verbreitete Carbapenemase. Aus dem Vereinigten Königreich stammen bisher die meisten Berichte über NDM-1-positive Bakterien. Am häufigsten Träger von NDM-1 ist die

Spezies *K. pneumoniae*, insgesamt ist das Speziesspektrum jedoch weiter als bei anderen Carbapenemasen und schließt auch *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. ein [15].

Verschiedene Studien belegen, dass das Vorkommen von Carbapenemase-bildenden Enterobacteriaceae in den letzten Jahren deutlich angestiegen ist [99]. In Deutschland und anderen mittel- bzw. westeuropäischen Ländern lag im Jahr 2014 die Prävalenz Carbapenem-unempfindlicher invasiver *K. pneumoniae*-Isolate noch unverändert unter 1 % [100]. In südeuropäischen Ländern wie Italien oder Griechenland lag der Anteil allerdings bereits bei 25 % - < 50 % (Vergleich 2010: 10 % - 25 %) bzw. > 50 % (Vergleich 2010: 25 % - 50 %). Auch in Spanien und Portugal ist ein Anstieg in den letzten Jahren zu verzeichnen [100].

### **2.3.2.2 Carbapenemasen in der Veterinärmedizin**

Bis zum Jahr 2011 lagen keinerlei Berichte über den Nachweis von Bakterien mit einer erworbenen Carbapenemase-Resistenz bei Tieren vor. Mit der steigenden Prävalenz in der Humanmedizin kam es aber auch bei Tieren in den vergangenen Jahren zu vermehrten Nachweisen derartiger Erreger (Tabelle 2). Die erste Carbapenemase bei Tieren beschrieben Poirel *et al.* bei *Acinetobacter* spp. aus dem Kot von Kühen [101]. Es folgten vereinzelte Nachweise bei *Acinetobacter* spp. von LM-liefernden Tieren in China [102, 103] und im Libanon, wo erstmalig das auf einem Plasmid lokalisierte *bla*<sub>OXA-58</sub>-Gen gefunden werden konnte [104]. Auch bei Hobbytieren gibt es Berichte über den Nachweis von Carbapenemase-bildenden *Acinetobacter* spp. [105, 106].

Auch zu dem Vorkommen von Carbapenemasen bei Enterobacteriaceae von Tieren gibt es einige Berichte (Tabelle 2). In Deutschland konnten z. B. Fischer *et al.* zwei VIM-1 produzierende *E. coli* in einem Schweinemastbetrieb und drei VIM-1 produzierende *Salmonella enterica* ssp. *enterica*-Isolate, die aus zwei unterschiedlichen Schweinemastbetrieben und einem Broilermastbetrieb stammten, nachweisen [22, 25]. Im Libanon konnte bei Geflügel im Jahr 2013 zudem ein OXA-48-bildendes *E. coli*-Isolat vom ST38 beschrieben werden [107]. In den USA zeigten sechs *E. coli*-Isolate von Hunden und Katzen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Meropenem und wiesen die Carbapenemase NDM-1 auf [23]. Auch in einigen weiteren Ländern wie Spanien, Ägypten und Algerien konnten bisher Carbapenemasen bei von Hobbytieren stammenden Enterobacteriaceae gefunden werden (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Bisherige Nachweise von Carbapenemase-Genen bei Tieren**

Spezies	Carbapenemase	Anzahl positive/untersuchte Isolate	Tierart	Land	Referenz
<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA-23	9/50	Rind	Frankreich	[101]
<i>A. Iwoffii</i>	NDM-1	1/396	Huhn	China	[102]
<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA-23	1/20/	Pferd	Niederlande	[105]
<i>A. baumannii</i>	NDM-1	1/1293	Schwein	China	[103]
<i>A. baumannii</i>	OXA-23	1	Katze	Portugal	[106]
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-45	1	Hund	China	[108]
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	9/115	Rind, Geflügel	Libanon	[104]
<i>A. baumannii</i>	OXA-23, -58	9/115	Schwein, Geflügel, Rind	Libanon	[104]
<i>Acinetobacter</i> spp., <i>E. coli</i>	NDM-1	6/334	Schwein	China	[109]
<i>A. baumannii</i>	OXA-23	1	Katze	Deutschland	[110]
<i>E. coli</i>	VIM-1	1/221	Schwein	Deutschland	[22]
<i>Salmonella enterica</i> <i>ssp. enterica</i>	VIM-1	3/221	Schwein, Geflügel	Deutschland	[25]
<i>E. coli</i>	NDM-1	6/944	Hund, Katze	USA	[23]
<i>Salmonella</i> Corvallis	NDM-1	1/184	Schwarzmilan	Deutschland	[111]
<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>	OXA-48	19/178	Hund, Katze	Deutschland	[112]
<i>E. coli</i>	OXA-48	1/40	Geflügel	Libanon	[107]
<i>E. coli</i>	OXA-48	13/2443	Hund, Katze	USA	[113]
<i>E. coli</i>	OXA-48, NDM-1	6/200	Hund, Katze	Algerien	[114]
<i>E. coli</i>	IMP-4, -26, -38	120/504	Silbermöwen	Australien	[115]
<i>Salmonella</i> Typhimurium	IMP-4	4	Katze	Australien	[116]
<i>E. coli</i>	OXA-48, OXA-181	5/114	Rind	Ägypten	[117]
<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	1/3	Hund	Spanien	[118]
<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, KPC, NDM	15/35	Huhn	Ägypten	[119]

### 3. Plasmidtypen bei Carbapenemase-produzierenden Enterobacteriaceae

Ein gängiges Schema zur Klassifizierung von (Resistenz)-Plasmiden bei Enterobacteriaceae stellt eine Einteilung in Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen) dar, deren Grundlage die Stabilität zweier Plasmide während einer Konjugation oder Transformation in einem Bakterium bildet. Plasmide derselben Inc-Gruppe sind zueinander inkompatibel, das heißt, sie können nicht stabil in einen Stamm übertragen werden, wohingegen dies bei Plasmiden unterschiedlicher Inc-Gruppen möglich ist [120]. Derzeit sind 25 verschiedene Inc-Gruppen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae bekannt [121]. Die IncFII-, IncN-, IncA/C-, IncL/M- und IncI1-Plasmide, die derzeit am häufigsten unter den typisierten ESBL- und AmpC-Gene tragenden Plasmiden vorkommen, werden auch als „epidemisch“ bezeichnet,

da sie in verschiedenen geografischen Regionen und verschiedenen Bakterien unterschiedlicher Herkunft auftreten [122]. Sie werden gleichermaßen beim Menschen als auch beim Tier nachgewiesen [123].

Insgesamt sind Resistenzplasmide sehr heterogen, das heißt, sie können Träger einer Vielzahl von unterschiedlichen Resistenzgenen sowie von weiteren Genen sein. Als Beispiel einer Co-Resistenz bei ESBL- und auch Carbapenemase-Bildnern ist die plasmidvermittelte Chinolonresistenz (PMQR) zu nennen. Dabei existieren drei Proteine, die diese Resistenz vermitteln: Qnr-Proteine, die Aminoglykosid-Acetyltransferase *Aac(6')-Ib-cr* und die Effluxpumpen *OqxAB* und *QepA* [124]. Obwohl die genannten PMQR-Proteine in den meisten Fällen nur eine „low-level“-Resistenz gegenüber den eingesetzten Fluorchinolonen („Fluorquinolones“, [FQ]) vermitteln, haben sie dennoch aufgrund ihrer häufigen Lokalisation auf ESBL-/AmpC- und auch auf Carbapenemase-Plasmiden eine wichtige Bedeutung bei der Problematik der Co-Selektion. Dabei kann es allein durch die Gabe von FQ zu einer Selektion einer  $\beta$ -Laktam-Resistenz kommen [123]. Es wird zudem vermutet, dass das Vorhandensein plasmidkodierter Resistenzmechanismen und eine dadurch vorhandene verringerte Empfindlichkeit gegenüber FQ eine Selektion chromosomaler Mutationen und somit die Ausbildung einer „high-level“-Resistenz erleichtert [124, 125].

In manchen Fällen scheint es eine Assoziation zwischen bestimmten Plasmiden und Resistenzgenen zu geben. Auch zwei Plasmide aus derselben Inc-Familie, die das gleiche Resistenzgen beherbergen, sind nicht zwangsläufig identisch und können durch Tragen von z. B. weiteren Resistenz- und/oder Virulenzgenen heterogen sein [122].

Bei der Verbreitung von Carbapenemasen spielen Plasmide eine entscheidende Rolle. So sind auch die Gene der 2008 erstmals beschriebenen Carbapenemase NDM-1 neben seltenen Ausnahmen plasmidkodiert [126]. Verschiedene Plasmidtypen wie IncA/C, IncHI1, IncF und IncL/M sind dabei an der Verbreitung des *bla*<sub>NDM-1</sub>-Gens beteiligt, wobei die beiden erstgenannten häufiger nachgewiesen werden als die übrigen. Die IncA/C-Plasmide sind ebenfalls mit der Verbreitung des *bla*<sub>CMY-2</sub>-Gens assoziiert. Man vermutet, dass zumindest ein Teil der NDM-1-IncA/C-Plasmide aus den *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden Plasmiden durch Erwerb eines *bla*<sub>NDM-1</sub>-Gens hervorgegangen ist [127]. Auch das in Deutschland gefundene NDM-1-positive *Salmonella* Corvallis-Isolat eines Schwarzmilans besaß ein IncA/C-Plasmid, auf dem sich zusätzlich zu dem *bla*<sub>NDM-1</sub>-Gen ein *bla*<sub>CMY-16</sub>-Gen befand [111]. CMY-16 unterscheidet sich von CMY-2 in zwei AS und ist durch Punktmutation aus dieser hervorgegangen [128].

Carbapenemasen vom VIM-Typ werden im Gegensatz zu denen vom NDM-Typ vorwiegend bei Non-Enterobacteriaceae nachgewiesen. Bei VIM-1 positiven *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten aus endemischen Gebieten in Griechenland war das Gen auf IncN-Plasmiden lokalisiert. Bei anderen Isolaten aus Spanien konnten wiederum Plasmide der IncI1- und IncHI2-Familie als Träger des Gens identifiziert werden, bei Isolaten aus Italien waren IncA/C-

Plasmide an der Verbreitung des *bla*<sub>VIM-4</sub>-Gens beteiligt [122]. IncHI2-Plasmide konnten auch bei den in deutschen Schweine- und Geflügelbetrieben nachgewiesenen VIM-1 produzierenden *E. coli*- bzw. *Salmonella* spp.-Isolaten als Träger des *bla*<sub>VIM-1</sub>-Gens identifiziert werden [22, 25].

Als ähnlich heterogen erweisen sich auch die *bla*<sub>KPC</sub>-Gene tragenden Plasmide. Neben IncF, IncL/M und IncN sind auch sog. „rolling circle replicating“-Plasmide, die bei ihrer Übertragung auf andere konjugierbare Plasmide angewiesen sind, mit der Übertragung von *bla*<sub>KPC</sub>-Genen assoziiert. Letztgenannte werden aber hauptsächlich bei grampositiven Bakterien nachgewiesen und spielen bei gramnegativen Bakterien eine untergeordnete Rolle [129].

Plasmide, die das *bla*<sub>OXA-48</sub>-Gen tragen und bereits in verschiedenen Ländern bei unterschiedlichen Spezies der Enterobacteriaceae und klonalen Gruppen gefunden werden konnten, weisen beim Vergleich hohe Ähnlichkeiten zueinander auf. Sie besitzen meist eine Größe von ca. 62 kb, sind transkonjugierbar, können mittels PCR-basierter Replikontypisierung den IncL-Plasmiden zugeordnet werden und weisen keine zusätzlichen Resistenzgene auf. Mittlerweile gibt es auch Beispiele von OXA-48-Plasmiden, die mit einer ungefähren Größe von 167 kb deutlich größer sind [130]. Auch in Deutschland konnten Pfeifer *et al.* derartige Plasmide in verschiedenen Enterobacteriaceae-Isolaten, die aus unterschiedlichen Krankenhäusern stammten, nachweisen [131]. Es wird aufgrund dieser Beobachtungen derzeit davon ausgegangen, dass als Ursprung für OXA-48 ein einziges Plasmid, von dem die weitere Verbreitung ausging, diente [132]. Die Derivate von OXA-48 können ebenfalls auf besagtem oder auf anderen Plasmiden anderer Plasmidfamilien lokalisiert sein [131, 132].

## 4. *E. coli* und *Klebsiella* spp.: Häufige ESBL-/AmpC-Bildner

### 4.1 *E. coli*: Infektionsmedizinische Bedeutung und Einteilung in phylogenetische Gruppen und Pathotypen

Die weltweit am häufigsten ESBL-produzierende Spezies ist *E. coli* [133]. Als Kommensale gehören sie zu der physiologischen Darmmikrobiota warmblütiger Tiere und des Menschen. Angesiedelt im Caecum und Colon stellt *E. coli* die größte aerobe Bakterienpopulation innerhalb des Darms dar und bewahrt den Wirt vor der Besiedlung durch pathogene Bakterien z. B. durch die Bildung von Bakteriocinen [134]. Nur in seltenen Fällen, z. B. bei Immunsuppression oder bei Zerstörung der Darmbarriere, kann es zu einer Infektion auch durch kommensale *E. coli* kommen [135]. Einige *E. coli* sind durch den Erwerb von VAGs in der Lage andere Bereiche wie den Dünndarm oder den Urogenitaltrakt zu besiedeln und dort eine Vielzahl an Infektionen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zu verursachen. Systemische Infektionen wie eine Sepsis aber auch nosokomiale Pneumonien und Peritonitis kön-

nen ebenso durch pathogene *E. coli* hervorgerufen werden [5]. Die Klassifizierung von *E. coli* beruht allgemein auf der Unterteilung in intestinal pathogene *E. coli* (InPEC) und extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC). In beiden Bereichen gibt es verschiedene Pathovaren, die anhand ihrer VAGs und z. T. auf Basis phänotypischer Eigenschaften definiert werden.

Innerhalb der Spezies *E. coli* existieren verschiedene genetische Substrukturen. 1984 veröffentlichten Ochman und Selander eine Sammlung von 72 *E. coli*-Isolaten („ECOR“, *E. coli* reference), die repräsentativ die Breite dieser Diversität auch unter Berücksichtigung der geografischen Verbreitung und betroffener Wirtsspezies darstellen sollten [136]. Clermont *et al.* entwickelten 2000 eine Triplex-PCR, in der durch Vorhandensein oder Abwesenheit von drei Markergenen bzw. -gensequenzen eine einfache Zuordnung der *E. coli*-Isolate in die vier wichtigsten phylogenetischen Gruppen (A, B1, B2 oder D) möglich war [137]. 2012 wurde das Gruppenspektrum aufgrund von MLST- und Genomdaten auf die derzeit acht phylogenetischen Gruppen (A, B1, B2, C, D, E, F, *Escherichia* cryptic clade I) erweitert, die mittels zwei Multiplex-PCRs bestimmt werden können [138]. Während ExPEC meist zur Gruppe B2 oder seltener zur Gruppe D gehören, werden kommensale *E. coli* meist der Gruppe A zugeteilt [5]. InPEC kommen in allen Gruppen vor [139, 140].

## **InPEC**

Zu den InPEC gehören STEC (Shigatoxin-bildende *E. coli*, darunter fallen EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) und EDEC (edema disease *E. coli*)), des Weiteren EPEC (enteropathogene *E. coli*), ETEC (enterotoxische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EAEC (enteroaggregative *E. coli*) und DAEC (diffus adhärente *E. coli*). STEC, EDEC und ETEC besitzen eine Bedeutung in der Veterinärmedizin und werden im Folgenden genauer beschrieben.

### **1. STEC**

Als STEC wird jedes *E. coli*-Isolat bezeichnet, das in der Lage ist Shigatoxin 1 oder 2 zu bilden [141]. Vom Shigatoxin 2 sind derzeit fünf Subtypen bekannt (Stx2c-f und Stx2d-activatable) [142]. Stx2e wird hauptsächlich von jenen STEC-Isolaten gebildet, die die Ödemkrankheit der Schweine auslösen. Sie bilden eine eigene Untereinheit der STEC und werden als EDEC bezeichnet. F18-Fimbrien vermitteln die für die Infektion nötige Adhäsion an die Darmepithelzellen [143].

Jene STEC-Isolate, die Auslöser einer hämorrhagischen Diarrhoe oder des hämolytisch-urämischen-Syndroms (HUS) beim Menschen sind, werden auch als EHEC bezeichnet. Als Hauptreservoir für EHEC gelten Wiederkäuer, insbesondere gesunde Rinder, die im adulten Alter häufig persistierend infiziert sind [142, 144]. Bei Kälbern können STEC Durchfall und Dysenterie auslösen [145].



## 2. ETEC

Als ETEC werden solche *E. coli*-Stämme bezeichnet, die in der Lage sind, mindestens ein Toxin aus den beiden Gruppen der hitzelablen und hitzestabilen Enterotoxine zu produzieren [146]. Von den hitzelablen Enterotoxinen (LT) sind bisher zwei Varianten (LT-I und LT-II) bekannt, wovon allerdings nur LT-I sowohl beim Menschen als auch beim Tier mit Durchfällen assoziiert und für die Charakterisierung von ETEC von Bedeutung ist [147]. Von den hitzestabilen Enterotoxinen (ST) existieren zwei voneinander unabhängige Klassen (STa und STb), die sich in Struktur und Funktion voneinander unterscheiden. Das STb ist besonders mit porcinen ETEC-Isolaten assoziiert [148]. Die Gene für beide Klassen sind vorwiegend auf Plasmiden lokalisiert [147].

Neben den Toxinen sind Fimbrien, die die Adhäsion an die Darmepithelzellen vermitteln, weitere wichtige Virulenzfaktoren der ETEC. Darunter fallen u. a. die Fimbrien F4, F5, F6, F17, F18 und F41, die nur bei den von Kälbern und Ferkeln isolierten ETEC-Isolaten, jedoch nicht bei anderen Tieren vorzukommen scheinen [149].

## 3. EPEC

Als wichtigstes Merkmal der EPEC zählt die Produktion von A/E-Läsionen bei der gleichzeitigen Abwesenheit von Shigatoxinen. Letzteres gilt dabei als wichtiges Unterscheidungskriterium zu STEC-Isolaten, die ebenfalls durch die Bildung von A/E-Läsionen charakterisiert sind. Die genetische Grundlage zur Bildung der A/E-Läsionen bildet eine Pathogenitätsinsel, auf der unter anderem das Gen (*eae*) für das Intimin liegt. Diese Pathogenitätsinsel ist bei allen EPEC-Stämmen vorhanden. Aufgrund der An- oder Abwesenheit eines zusätzlichen Virulenzplasmids kann zwischen typischen und atypischen EPEC unterschieden werden. Typische EPEC besitzen das sogenannte EPEC Adherence Factor (EAF)-Plasmid, das für die genetische Information für die zu den Typ IV-Fimbrien gehörenden Bundle-Forming-Pili (BFP) kodiert. Atypische EPEC hingegen, die überwiegend bei Tieren nachgewiesen werden, besitzen dieses Plasmid nicht [150].

## ExPEC

UPEC (uropathogene *E. coli*), NMEC (Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli*), SEPEC (Sepsis-assoziierte *E. coli*) und APEC (aviäre pathogene *E. coli*) bilden die Gruppe der ExPEC [147, 151, 152]. ExPEC sind fakultativ pathogene *E. coli*, deren natürliches Habitat der Darm darstellt. Sie sind gekennzeichnet durch ihre komplexe Phylogenie, die große Varianz an VAGs und ein stark variierendes klinisches Bild [153]. Nach Übertreten der Darmschranke, was i. d. R. eine Immunsuppression des Wirts voraussetzt, besitzen sie mit ihrem vielfältigen Spektrum an VAGs die Fähigkeit, sich in verschiedenen Geweben wie z. B. im zentralen Nervensystem, im Respirationstrakt, in Wunden oder im Harntrakt anzusiedeln und dort Erkrankungen des jeweiligen Gewebes auszulösen [152, 154]. Es können aber auch

Infektionen im immunkompetenten Wirt auftreten. So sind unter den ExPEC die UPEC am häufigsten mit Erkrankungen in immunkompetenten Wirten assoziiert [155].

Obwohl zahlreiche VAGs für bestimmte ExPEC als typisch beschrieben worden sind, existiert keine Definition wie bei den InPEC, die eine Abgrenzung zu kommensalen *E. coli* oder eine eindeutige Identifizierung einzelner ExPEC-Pathotypen aufgrund der Anwesenheit bestimmter VAGs möglich macht [154]. Zu den wichtigsten Virulenzdeterminanten zählen neben Adhäsinen und Toxinen auch Eisenaufnahmesysteme, Lipopolysaccharide, Polysaccharidkapseln und Invasine [154, 156].

Auffällig ist, dass es bisher nur wenige Studien gibt, die Aufschluss darüber geben, wie häufig InPEC und auch ExPEC Träger von ESBL- oder auch AmpC-Genen sind. Systematische Monitoringstudien (z. B. zusammengefasst von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA)) basieren i. d. R. auf dem Screening von kommensalen *E. coli*, bei dem eine Untersuchung auf VAGs nicht erfolgt [17]. Das nationale Monitoringprogramm GERM-Vet, dessen Ergebnisse im GERMAP-Bericht veröffentlicht werden, untersucht zwar klinische *E. coli* Isolate von unterschiedlichen Tierarten- jedoch fehlt auch hier eine weitere Untersuchung der Isolate u. a. auf VAGs [157]. Die bisher zu diesem Thema durchgeführten Studien umfassen i. d. R. einen geringen Probenumfang und beziehen sich größtenteils auf den Menschen. Aus Deutschland gibt es insbesondere zu der Verbreitung von ESBL-bildenden InPEC und ExPEC-Isolaten bei Haussäugetieren nur wenige Informationen.

Bei InPEC befassen sich die meisten Studien vermutlich aufgrund der Relevanz für die Humanmedizin mit STEC-ESBL-produzierenden *E. coli*. Bisher konnten acht humane Isolate identifiziert werden, die gleichzeitig Träger eines ESBL- und eines Shigatoxin-Gens waren, den Ausbruchsstamm O104:H4 aus Deutschland aus dem Jahre 2011 inkludiert (Tabelle 36). Zudem konnten bisher sechs ESBL-STEC-produzierende *E. coli* von Tieren beschrieben werden, wobei drei von Rindern und ein Isolat vom Geflügel stammt. Auch zwei Stx2-produzierende *E. coli*-Isolate von Schweinen mit Diarrhoe wurden kürzlich als Träger von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> beschrieben. Eine weitere Studie beschreibt das Vorkommen ESBL-bildender ETEC- Isolate und eines ESBL-bildenden-EPEC-Isolats (Tabelle 36).

Auch ExPEC können Träger von ESBL-/AmpC-Genen sein. CTX-M-produzierende *E. coli* sind z. B. eine häufige Ursache von Infektionen des unteren Harnwegsapparates, Bakteriämien und intraabdominalen Infektionen [158]. Es scheinen jedoch nur einige weltweit vorkommende ExPEC-assoziierte ST (ST131, ST648, ST405, ST410, ST38) häufiger ein ESBL-Plasmid zu tragen und eine Rolle bei der Verbreitung von ESBL zu spielen [159-161] (s. auch 5.1). Verschiedenen Studien über *E. coli* zufolge sind das Vorkommen von VAGs bzw. die Zugehörigkeit zur phylogenetischen Gruppe B2 und das Auftreten von Antibiotikaresistenzen negativ assoziiert [162-165]. Das bedeutet, dass bei einer Infektion die Mechanismen

der Antibiotikaresistenz bei vorhandenem Antibiotikaselektionsdruck einen deutlichen Fitnessvorteil gegenüber denen der VAGs darstellen [166]. Pathogene *E. coli* scheinen also insgesamt seltener Träger von Resistenzgenen zu sein als kommensale *E. coli*. Dies zeigte sich auch in einer Studie aus dem Jahr 2014, in der die phylogenetischen Gruppen von 15 empfindlichen und 18 als multiresistent bezeichneten *E. coli*-Isolaten, die aus Infektionen des Harnwegsapparates von Hunden stammten, bestimmt wurden. Es zeigte sich, dass sich der überwiegende Teil der empfindlichen Isolate (n=10) der Gruppe B2 zuordnen ließ, wohingegen nur zwei der 18 multiresistenten Isolate dieser Gruppe angehörte [167]. Auch in einer weiteren Studie waren FQ-sensible *E. coli* aus Zystitiden von Frauen signifikant mit der phylogenetischen Gruppe B2 assoziiert, wohingegen FQ-resistente *E. coli* signifikant mit non-B2-Gruppen assoziiert waren [168].

## 4.2 *Klebsiella* spp.: Infektionsmedizinische Bedeutung

Von den 15 derzeit existierenden *Klebsiella*-Spezies (<http://www.bacterio.net/allnamesdl.html>; Zugriff 13.11.16) werden in der Humanmedizin bei klinischen Infektionen am häufigsten *K. pneumoniae* und - mit deutlichem Abstand - *K. oxytoca* isoliert. Auch in der Veterinärmedizin ist *K. pneumoniae* die am häufigsten bei Erkrankungen nachgewiesene *Klebsiella*-Spezies [6, 169]. Es handelt sich dabei um einen opportunistischen Erreger, der weltweit Verursacher insbesondere von nosokomialen aber auch von ambulant erworbenen Infektionen ist. Laut des NRZ für Surveillance von nosokomialen Infektionen ließen sich 3,5 % der 2011 innerhalb der Deutschen Nationalen Punkt-Prävalenzstudie ermittelten NI auf *K. pneumoniae* zurückführen. Bei nosokomialen Harn- und Atemwegsinfektionen zählt *K. pneumoniae* zu den vier am häufigsten nachgewiesenen Bakterien und ist bei Harnwegsinfektionen der zweithäufigste gramnegative Erreger nach *E. coli* [170]. Wie groß der Anteil an *K. pneumoniae*-bedingten Infektionen bei Tieren ist, lässt sich nur schwer beurteilen, da es an aussagekräftigen Studien mangelt. *K. pneumoniae* kommt im Gegensatz zu einigen anderen Enterobacteriaceae in der Umwelt vor und ist zudem ein Saprophyt vieler Schleimhäute verschiedener Säugetierspezies einschließlich des Menschen [171]. Beim Menschen kolonisiert *K. pneumoniae* die Schleimhäute des Nasopharynx und des Colons. Die Besiedlung der Schleimhäute gilt daher neben der Kontamination der Hände des Krankenhauspersonals als Hauptquelle für eine NI [171]. Generell ist eine Infektion jeden Gewebes mit *K. pneumoniae* möglich, am häufigsten betroffen sind jedoch die Lunge und die unteren Harnwege [6, 172]. Insgesamt sind eher immunsupprimierte oder durch andere Infektionen geschwächte Individuen betroffen [173]. Eine Ausnahme bilden die meist ambulant erworbenen durch *K. pneumoniae* ausgelösten Leberabszesse, die in den letzten drei Jahrzehnten stark an Bedeutung zugenommen haben. Anfänglich nur im asiatischen Raum beschrieben gibt es mittlerweile Berichte über das Vorkommen auf anderen Kontinenten [174-176]. Wie auch bei

den meisten anderen *K. pneumoniae*-Infektionen wird der Gastrointestinaltrakt als Reservoir angesehen [172, 175].

Die Bildung einer Polysaccharidkapsel, die dem Bakterium neben Schutz vor Phagozytose auch eine Serumresistenz und vermutlich eine erhöhte Tenazität verschafft, wird als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *K. pneumoniae* angesehen [6]. Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese von *K. pneumoniae* spielen Fimbrien, die die erste Anheftung an die Wirtszelle vermitteln. Bei *K. pneumoniae* kommen zwei (Typ 1 und Typ 3) der für Enterobacteriaceae beschriebenen Fimbrientypen am häufigsten vor. Während Typ 1-Fimbrien essentiell für die Pathogenese von Harnwegsinfektionen sind, sind Typ 3-Fimbrien u. a. wichtig für die Biofilmbildung [177].

## **5. Multilokus-Sequenztypen ESBL-/AmpC- und Carbapenemase-bildender *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate**

### **5.1 Multilokus-Sequenztypen ESBL- und Carbapenemase-bildender *E. coli*-Isolate**

Die MLST stellt vor der zunehmenden Bedeutung der Ganzgenom-Analyse noch immer eine Standardmethode zur Typisierung von Bakterien dar. Dabei werden sieben hochkonservierte „Housekeeping-Gene“, die für am Grundstoffwechsel des Bakteriums beteiligte Enzyme oder Proteine kodieren, sequenzanalysiert. Unterschiedlichen Gensequenzen eines „Housekeeping-Gens“ werden bestimmte Allele zugeordnet. Die sieben Sequenz-Allele eines Isolats ergeben das Allel-Profil bzw. den ST der in MLST-Datenbanken abgeglichen werden kann. Es können dadurch Aussagen über den Verwandtschaftsgrad einzelner Isolate innerhalb einer Population und die globale Verbreitung einzelner Klone bzw. deren Beteiligung an endemischen Ausbrüchen getroffen werden [178]. *E. coli* gilt als eine schwach klonale Spezies, für die derzeit 6875 ST definiert sind (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>, Stand 29.10.16). Umso interessanter ist die aus zahlreichen Untersuchungen gewonnene Erkenntnis, dass unter ESBL-/AmpC-produzierenden Isolaten bestimmte ST (ST10, 38, 101, 131, 405, 410, 648) vermehrt nachgewiesen wurden [4, 123, 161, 179-183].

Bei der Verbreitung von ESBL und AmpC (insbesondere aber der CTX-M-Enzyme) spielt der erstmals im Jahr 2008 beschriebene ST131 eine herausragende Rolle. Diese pandemische klonale Gruppe besitzt häufig die ESBL CTX-M-15 und andere Resistenzmechanismen (z. B. gegenüber Fluorchinolonen) und zudem oftmals viele Virulenzfaktoren, die auch plasmidkodiert vorliegen können [184, 185]. Beim Menschen sind *E. coli* vom ST131 Verursacher von Septikämien und Infektionen des Harnwegsapparates und konnten bereits auf allen Konti-

nenten mit unterschiedlichen Häufigkeiten gefunden werden [9]. Sie gehören zu der phylogenetischen Gruppe B2. Andere ST aus dieser Gruppe, die weltweit von Bedeutung sind (zum Beispiel ST95 oder ST73), sind eher selten Träger von ESBL-/AmpC-Genen [4].

Auch bei Tieren konnten *E. coli* des ST131 sowohl mit als auch ohne ESBL-Plasmid in mehreren Studien bei kranken aber auch als Teil der Darmmikrobiota bei gesunden Hobby- und Nutztieren nachgewiesen werden [186-190]. Die Häufigkeit liegt bei Hobbytieren höher als bei Nutztieren, insgesamt jedoch im niedrigen Bereich. So lag sie z. B. bei Ewers *et al.* bei 5,6 % von 177 getesteten ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten von Hobbytieren [191] und bei Mora *et al.* bei 1,5 % von 463 retrospektiv untersuchten *E. coli*-Isolaten von Geflügel [192]. In derselben Studie erwiesen sich 7 % der in verpacktem Geflügelfleisch gefundenen *E. coli*-Isolate als dem ST131-Komplex zugehörig. Zudem konnte in einigen Studien eine Ähnlichkeit zwischen tierischen und humanen ST131-Isolaten in Bezug auf Resistenzeigenschaften, Virulenzgene und Genotyp aufgezeigt werden, was auf einen Inter-Spezies-Transfer hindeuten könnte [4, 188, 193, 194]. Ein eindeutiger Beweis dafür fehlt jedoch bisher [185].

Neben zahlreichen weiteren ST sind an der weltweiten Verbreitung von ESBL und AmpC und insbesondere der CTX-M-Enzyme in der Humanmedizin auch *E. coli* vom ST405, ST410 und vom ST38 beteiligt, die als ExPEC-Isolate der phylogenetischen Gruppe D zugeordnet sind [5, 181, 182, 195-199]. Auch in der Veterinärmedizin konnten diese ST als Träger von ESBL-Plasmiden gleichermaßen bereits bei Klein- [74, 189, 200] bei Nutz- [201, 202] und sogar bei Zoo- und Wildtieren [161, 203] gefunden werden. Schaufler *et al.* untersuchten in einer Studie zehn ESBL-bildende *E. coli*-Isolate, die sowohl von Wildvögeln (3) vom Menschen (3) und von Hunden (4, davon ein klinisches Isolat) stammten, auf ihre Klonalität. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Analyse des Plasmidprofils und Genomsequenzierung konnte gezeigt werden, dass die Isolate eine hohe genetische Ähnlichkeit aufwiesen, sodass von einer Übertragung zwischen den verschiedenen Spezies und der Umwelt ausgegangen werden muss [161]. Es scheinen also - auch unter Betrachtung der Verbreitung des ST131- sowohl bei Nutz- als auch bei Hobbytieren, wenn auch in unterschiedlichen Häufigkeiten, die gleichen Genotypen an der Verbreitung von ESBL-/AmpC beteiligt zu sein.

Der ST648, der nach dem neuen Clermont-Schema in Gruppe F (früher Gruppe D) eingeordnet wird, ist ebenfalls häufig mit einer ESBL (meist CTX-M-15) assoziiert. Er konnte in dieser Kombination bisher bei Menschen, Haus- und Wildtieren sowie aus Umweltproben isoliert werden [62, 160, 183, 188, 200, 204, 205]. Ewers *et al.* konnten bei 1152 untersuchten ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten verschiedener Tierarten eine Häufigkeit von 3,5 % für den ST648 feststellen. Beim Vergleich mit ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten vom ST131, deren Häufigkeit in dieser Studie bei 2,8 % lag, fiel auf, dass die F-ST648-Isolate deutlich höhere MHK-Werte in allen untersuchten Antibiotikaklassen aufwiesen. B2-ST131 ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate besitzen hingegen oftmals mehr Virulenzgene, jedoch weisen

auch einzelne F-ST648-Stämme ein ähnliches Virulenzgenmuster auf. Es handelt sich also hierbei um einen weiteren ST, der Multiresistenz und Virulenz effektiv miteinander kombinieren kann und an klinischer Relevanz dazugewinnen könnte [183].

Die ST, die in Verbindung mit der Verbreitung von Carbapenemasen bei humanen Isolaten stehen, unterscheiden sich größtenteils nicht von den oben genannten. So konnten *E. coli* vom ST101, ST405, ST410, ST38 und auch vom ST131 bereits öfter als Träger eines *bla*<sub>NDM-1</sub>-oder auch eines *bla*<sub>OXA-48</sub>-Gens identifiziert werden [4, 206-211]. Auch die häufig in *K. pneumoniae* vorkommende Carbapenemase KPC konnte bereits vereinzelt in *E. coli* vom ST131 und ST405 nachgewiesen werden [212, 213]. In der Veterinärmedizin konnte bisher ebenfalls ein *E. coli* vom ST38 als Träger einer Carbapenemase ausgemacht werden [107]. Weitere ST tierischer *E. coli*-Isolate, bei denen ein Carbapenemase-Gen nachgewiesen werden konnte, sind ST88, ST216, ST58, ST354, ST167 und ST224 [22, 115]. Die ST ST131 und ST405 wurden in der Veterinärmedizin bisher nicht als Träger von Carbapenemase-Genen identifiziert.

## **5.2 Multilokus-Sequenztypen ESBL- und Carbapenemase bildender *K. pneumoniae*-Isolate**

Für *K. pneumoniae* sind derzeit durch MLST 2421 ST definiert (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>, Stand 29.10.2016). Humane *K. pneumoniae*-Isolate weisen eine hohe genetische Diversität auf. So konnten Diancourt *et al.* unter 67 untersuchten Isolaten 40 verschiedene ST identifizieren [214]. Brisse *et al.* konnten 117 verschiedene ST bei 235 untersuchten Isolaten ausmachen. Die Isolate stammten dabei sowohl vom Menschen als auch von Tieren und neben Afrika und Asien hauptsächlich aus europäischen Ländern. Die klonalen Komplexe (CCs) CC15, CC23 und CC258 schienen dabei innerhalb der gesamten *K. pneumoniae*-Population häufiger vorzukommen als andere klonale Gruppen [169]. Ähnlich wie bei *E. coli* scheinen aber auch hier einige phylogenetischen Linien häufiger an der Verbreitung von  $\beta$ -Laktamase-Genen beteiligt zu sein als andere [215]. Dennoch ist die Verbreitung ESBL-/AmpC- und Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate insgesamt multiklonal, da innerhalb dieser Population bisher über 130 verschiedene ST ermittelt werden konnten. Ewers *et al.* untersuchten in ihrer Studie 1519 *Klebsiella* spp.-Isolate auf ESBL-Produktion. 5,9 % der Isolate erwiesen sich als ESBL-Bildner, 85,5 % ließen sich davon dem ST15 zuordnen, unter diesen dominierte die ESBL CTX-M-15. Zu beachten ist, dass es sich hierbei zum Teil um Isolate aus Ausbruchsgeschehen handelte, die über einen Zeitraum von 18 Monaten mehrmals aus derselben Klinik isoliert wurden [215]. Insgesamt decken sich diese Beobachtungen mit Ergebnissen humanmedizinischer Studien. Auch hier war der ST15 mit am häufigsten vertreten [216, 217]. Zu

davon abweichenden Ergebnissen kamen Poirel *et al.* in einer anderen veterinärmedizinischen Studie. Es wurden 205 Rektum- und Urinproben von Haus- und Wildtieren auf ESBL-Bildner untersucht. Von 15 CTX-M-15-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten erwiesen sich 14 dem ST274 und nur eins dem ST15 zugehörig. Die Möglichkeit eines lokalen klonalen Geschehens kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, da alle Proben im unmittelbaren oder zumindest im geografischen Zusammenhang mit derselben veterinärmedizinischen Klinik standen [218].

*K. pneumoniae*-Isolate vom ST15 wurden zudem in der Humanmedizin bereits oftmals als Träger von Carbapenemasen beschrieben, so zum Beispiel von OXA-48 [219, 220], VIM-like [221, 222] und NDM-1 [210, 223]. Ein wichtiger weltweiter klonaler ST, der mit der Verbreitung der Carbapenemase KPC in Verbindung steht, ist der ST258. Er wurde erstmalig 2009 in den USA nachgewiesen und konnte bisher weltweit als Träger eines *bla*<sub>KPC</sub>-Gens detektiert werden [224, 225]. Durch eine vergleichende Genomanalyse besteht derzeit der Verdacht, dass es sich bei ST258 um einen Hybrid-Klon handelt. Achtzig Prozent des Genoms sind identisch mit dem von ST11-Isolaten, 20 % mit dem von ST442-Isolaten [226]. Beim ST11, der wiederum z. B. in China den vorherrschenden ST KPC-produzierender Klebsiellen darstellt [227], handelt es sich um einen erfolgreichen epidemischen Klon, der sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als Träger von ESBL bekannt ist [216, 228, 229]. In der Humanmedizin wurde er zudem häufig als Träger von Carbapenemasen wie zum Beispiel OXA-48, NDM-1 oder VIM-1 beschrieben [230-233].

## III Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten und unter den Punkten 1.1 bis 1.4 genannten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind unter Angabe von Herstellerfirma und Artikelnummer im Anhang aufgelistet.

#### 1.2 Verwendete Computerprogramme

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wurden innerhalb dieser Arbeit die in Tabelle 3 genannten Computerprogramme verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Computerprogramme**

Computerprogramm	Firma	Verwendung
<b>BioNumerics Version 6.6-Software</b>	Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien	Auswertung der PFGE-Bandenmuster
<b>IBM SPSS Statistics, Version 22</b>	IBM, Armonk, USA	Statistische Auswertung des Kristallviolet-Mikrotiterplattentests
<b>Ridom Seqsphere+ Software, Version 1.0.1</b>	Ridom GmbH, Münster	Auswertung von Sequenzdaten mithilfe hinterlegter Datenbanken

#### 1.3 Herkunft der *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate

Sämtliche *E. coli*-Isolate aus klinischem Untersuchungsgut, das im Zeitraum vom 04.06.2012 bis zum 04.06.2013 im Rahmen der veterinärmedizinischen Routinediagnostik in das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (IHIT) gesendet wurde, wurden dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. So verhielt es sich auch mit den *Klebsiella* spp.-Isolaten, die im Zeitraum vom 04.06.2012 bis zum 04.02.2014 aus klinischem Untersuchungsgut gesammelt wurden. Die Speziesdifferenzierung der Isolate erfolgte anhand der für die jeweilige Spezies typischen biochemischen Reaktionen [234]. Eine Vorauswahl der Isolate in Bezug auf klinische Herkunft oder Tierart wurde nicht vorgenommen.

Diese Arbeit erhebt folglich keinen Anspruch auf eine epidemiologische Studie mit definiertem Probandesign. Einsender des Untersuchungsguts waren > 400 Tierarztpraxen und -kliniken aus ganz Deutschland, darunter auch die verschiedenen Kliniken und Institute des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen.



## 1.4 Verwendete Kontroll- und Referenzstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Kontroll- bzw. Referenzstämme sind unter Angabe ihrer Originalnummer, Herkunft und Funktion in Tabelle 47, Tabelle 48 und Tabelle 49 im Anhang aufgelistet.

## 2. Methoden

### 2.1 Phänotypische Charakterisierung

Sowohl der Nachweis von ESBL- als auch von Carbapenemase- bildenden *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten erfolgte gemäß den CLSI-Richtlinien in einem zweistufigen Prozess, der aus initialem Screening mit einer vorgeschriebenen Indikatorsubstanz und einem phänotypischen Bestätigungstest, wie im Folgenden beschrieben, besteht [235, 236].

#### 2.1.1 Screening von *E. coli* und *Klebsiella* spp. auf reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen

Als Screening-Agar wurde der sogenannte „ESBL-Agar“ (MacConkey-Agar + 1 µg/ml Cefotaxim) verwendet. Dieser dient in erster Linie dem Nachweis von ESBL-Bildnern. Auch AmpC-bildende Enterobacteriaceae, auf die in der vorliegenden Arbeit nicht gezielt untersucht wurde, können auf diesem Agar wachsen, jedoch handelt es sich bei Cefotaxim nicht um die von der CLSI vorgeschriebene Indikatorsubstanz. So ist es möglich, dass nicht alle tatsächlich vorhandenen AmpC-Bildner mithilfe dieses Screenings nachgewiesen wurden.

Von jedem *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolat wurde eine Kolonie von der Blutagarplatte (BAP) mit einer sterilen Öse abgenommen und auf dem Screening-Agar ausgestrichen. Dieser wurde anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde *K. pneumoniae* ATCC® 700603, als Negativkontrolle *E. coli* ATCC® 25922 mitgeführt.

#### 2.1.2 Phänotypischer Bestätigungstest (ESBL-Bestätigungstest)

Mit allen im Screening nach 2.1.1 positiv getesteten Isolaten wurde ein phänotypischer Bestätigungstest entsprechend des CLSI-Dokuments Vet01S durchgeführt [235]. Dafür wurden zwei bis drei Kolonien von der BAP mit einem sterilen Wattetupfer abgenommen, in 3 ml NB-I-Medium suspendiert und auf eine Trübung von 0,5 McFarland Standard eingestellt. Das nachfolgende Ausstreichen auf einer Müller-Hinton (MH)-Agar-Platte sowie das Aufbringen der Testplättchen (Cefotaxim (30 µg), Ceftazidim (30 µg), Cefotaxim/Clavulansäure (30 µg/10 µg), Ceftazidim/Clavulansäure (30 µg/10 µg)) erfolgte gemäß der Richtlinie. Nach einer Inkubation bei 37°C für 18 h wurden alle Hemmhöhen gemessen und dokumentiert.

Eine Vergrößerung des Zonendurchmessers um  $\geq 5$  mm für einen der beiden antimikrobiellen Substanzen in Kombination mit Clavulansäure gegenüber der Hemmhofzone bei einer alleinigen Testung ohne Clavulansäure gilt als Bestätigung für eine ESBL-Bildung. Bei Vergrößerung des Zonendurchmessers um  $\leq 5$  mm besteht der Verdacht einer AmpC-Bildung. Das Vorhandensein einer verminderten Empfindlichkeit der Isolate gegenüber den getesteten Antibiotika ohne Clavulansäure ist Grundvoraussetzung für die Auswertung des Tests. Es wurden wöchentlich die Stämme *E. coli* ATCC® 25922 und *K. pneumoniae* ATCC® 700603 als Negativ- bzw. Positivkontrolle mitgeführt.

### **2.1.3 Screening von *E. coli* und *Klebsiella* spp. auf reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen**

Für dieses Screening wurde in 1 ml NB-I-Medium jeweils mit einer sterilen Öse eine Kolonie der zu testenden Isolate gegeben und ein Meropenem-Antibiotikatestplättchen (10 µg) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Eine danach festzustellende Trübung des Mediums wurde als positives Ergebnis gewertet. Als Positivkontrolle wurde wöchentlich der Stamm *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, als Negativkontrolle der Stamm *E. coli* ATCC® 25922 mitgeführt.

### **2.1.4 Modifizierter Hodge-Test**

Mit allen nach 2.1.3 positiv getesteten Isolaten wurde als phänotypischer Bestätigungstest der modifizierte Hodge-Test (MHT) gemäß des CLSI-Dokuments M100S durchgeführt [236]. Dafür wurde von einem Carbapenemase-empfindlichen *E. coli*-Stamm (ATCC® 25922) wie unter 2.1.2 beschrieben ein Inokulum hergestellt und dieses auf zwei MH-Platten ausgestrichen. In die Mitte der einen Platte wurde ein Meropenem-, in die Mitte der anderen Platte ein Ertapenem-Antibiotikatestplättchen (jeweils 10 µg) gelegt. Drei bis fünf Kolonien des zu testenden Bakterienisolates wurden dann strichförmig mithilfe einer sterilen Einmal-Öse vom Antibiotikatestplättchen ausgehend über 20-25 mm in Richtung Plattenrand ausgestrichen. In der gleichen Weise wurden jeweils auch die Negativ- und die Positivkontrolle (Tabelle 49) auf die Platten aufgebracht. Die Inkubation erfolgte über 18 h bei 37°C. Ein Hineinwachsen des sensiblen Indikatorstamms in den Hemmhof am Kreuzungspunkt mit dem Impfstrich des zu testenden Keimes galt als positiv.

## 2.1.5 Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung

### 2.1.5.1 Agardiffusionstest bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten

Zur Empfindlichkeitsprüfung der ESBL-bildenden bzw. der AmpC-verdächtigen Isolate gegenüber der in Tabelle 4 genannten Antibiotika wurde der Agardiffusionstest gemäß den Standards der CLSI [235] durchgeführt.

Von jedem Isolat wurde ein Inokulum wie unter 2.1.2 beschrieben hergestellt. Das nachfolgende Ausstreichen auf einer MH-Platte erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben. Die Antibiotikatesplättchen wurden danach mithilfe eines Dispensers in gleichmäßigen Abständen auf die Platte aufgebracht. Die Bebrütung erfolgte über 18 h bei 37°C. Danach wurden alle Hemmhofdurchmesser gemessen und dokumentiert. Eine Auswertung erfolgte nach Interpretationsstandards der CLSI [235, 236]. Bei Fehlen spezifischer Angaben zur Interpretation von Hemmhöfen bei *Klebsiella* spp. wurde sich an den gegebenen Werten für *E. coli* orientiert.

**Tabelle 4: Verwendete Antibiotika und Standards zur Interpretation**

Antibiotikum	Konzentration pro Plättchen	Interpretation (Hemmhofdurchmesser in mm)		
		Sensibel	Intermediär	Resistent
Ertapenem <sup>2</sup>	10 µg	≥22	19-21	≤18
Imipenem <sup>1</sup>	10 µg	≥23	20-22	≤19
Amoxicillin/Clavulansäure <sup>1</sup>	20 µg/10 µg	≥18	14-17	≤13
Cefotaxim <sup>2</sup>	30 µg	≥26	23-25	≤22
Cefquinom <sup>3</sup>	30 µg	≥23	20-22	≤19
Enrofloxacin <sup>1</sup>	5 µg	≥23	17-22	≤16
Ciprofloxacin <sup>2</sup>	5 µg	≥21	16–20	≤15
Pradofloxacin <sup>1</sup>	5 µg	≥24	20-23	≤19

1= [235]; 2= [236]; 3= nach Rosco Diagnostica, Taastrup (DK): "Interpretation of the Antibiotogramme with Neo-Sensitabs"

### 2.1.5.2 MHK-Bestimmung mittels VITEK 2-System bei Carbapenemase-bildenden Isolaten

Bei Carbapenemase-bildenden Isolaten wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) für die in Tabelle 5 gelisteten Antibiotika mittels des VITEK 2-Systems bestimmt. Es wurde die Testkarte AST-GN38 (bioMérieux, Nürtingen) für gramnegative Bakterien verwendet.

**Tabelle 5: Überblick über die auf der Testkarte AST-GN38 vorhandenen Antibiotika, deren Konzentrationsbereiche und Interpretationsstandards**

Klasse	Antibiotikum	Konzentrationsbereich in mg/L	MHK-Interpretation (mg/L)		
			S	I	R
<b>β-Laktam-Antibiotika</b>	Amoxicillin/Clavulansäure	2/1-32/16	≤8 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	≥32 <sup>2</sup>
	Piperacillin	4-64	≤16 <sup>2</sup>	32-64 <sup>2</sup>	≥128 <sup>2</sup>
	Ampicillin	4-32	≤8 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	≥32 <sup>2</sup>
	Cefalexin	8-64	≤8 <sup>3</sup>	16 <sup>3</sup>	≥32 <sup>3</sup>
	Cefpirom	2-64	≤4 <sup>4</sup>	8 <sup>4</sup>	≥16 <sup>4</sup>
	Cefpodoxim	0,5-4	≤2 <sup>1</sup>	4 <sup>1</sup>	≥8 <sup>1</sup>
	Ceftiofur	1-2	≤2 <sup>1</sup>	4 <sup>1</sup>	≥8 <sup>1</sup>
	Imipenem	2-16	<1 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	≥4 <sup>2</sup>
<b>Fluorchinolone</b>	Enrofloxacin	0,25-4	≤0,5 <sup>1</sup>	1-2 <sup>1</sup>	≥4 <sup>1</sup>
	Marbofloxacin	1-2	≤1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	≥4 <sup>1</sup>
<b>Phenicol</b>	Chloramphenicol	4-32	≤8 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	≥32 <sup>2</sup>
<b>Aminoglykoside</b>	Gentamicin	4-32	≤2 <sup>1</sup>	4 <sup>1</sup>	≥8 <sup>1</sup>
	Amikacin	8-64	≤16 <sup>2</sup>	32 <sup>2</sup>	≥64 <sup>2</sup>
	Tobramycin	8-64	≤4 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	≥16 <sup>2</sup>
<b>Tetracycline</b>	Tetracyclin	2-8	≤4 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	≥16 <sup>2</sup>
<b>Potenzierte Sulfonamide</b>	Trimethoprim/Sulfamethoxazol	1/19-16/304	≤40 <sup>2</sup>		≥80 <sup>2</sup>
<b>Polypeptid-Antibiotika</b>	Polymyxin B	0,25-16	≤2 <sup>5</sup>		≥2 <sup>5</sup>
<b>Rifamycine</b>	Rifampicin	2-16	≤4 <sup>6</sup>	8 <sup>6</sup>	≥16 <sup>6</sup>
<b>Nitrofurane</b>	Nitrofurantoin	16-64	≤32 <sup>2</sup>	64 <sup>2</sup>	≥128 <sup>2</sup>

1= [235]; 2= [236]; 3= lt. Herstellerangaben analog zu Cephalothin nach [236]; 4= lt. Herstellerangaben analog zu Ceftazidim nach [237]; 5= lt. Herstellerangaben analog zu Colistin nach [36]; 6= lt. Herstellerangaben CA-SFM 2013 Non-Enterobacteriaceae (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2013)

Die zu testenden Bakterienstämme wurden auf BAP angezüchtet und üN bei 37°C bebrütet. Nach einer Subkultivierung auf BAP zur Herstellung einer gesicherten Reinkultur wurden in ein vom Hersteller mitgelieferten Plastikröhrchen 3 ml einer 0,45 %igen NaCl-Lösung gegeben und mithilfe eines Colorimeters eine Bakteriensuspension von 0,5 McFarland-Standard eingestellt. Von dieser Suspension wurden 200 µl in ein frisches Röhrchen mit 3 ml NaCl-Lösung gegeben. Anschließend wurden mit dieser Lösung die Testkarte bestückt sowie Reinheitskontrollen auf BAP angefertigt. Die Auswertung erfolgte nach Interpretationsstandards der CLSI [235-237]. Auch hier wurden bei Fehlen von spezifischen MHK-Werten für *Klebsiella* spp. die entsprechenden Werte für *E. coli* übernommen.

### 2.1.5.3 MHK-Bestimmung von Imipenem mittels Epsilometertest („E-Test“)

Für den Epsilometertest wurde von dem zu testenden Isolat ein Inokulum wie unter 2.1.2 beschrieben hergestellt. Das nachfolgende Ausstreichen auf einer MH-Platte erfolgte ebenfalls wie dort beschrieben. Anschließend wurde ein 15 Verdünnungsstufen des Wirkstoffes

Imipenem enthaltender E-Test-Streifen (bioMérieux, Nürtingen) mit einer sterilen Pinzette in die Mitte der Platte gelegt. Nach einer sich anschließenden Inkubation von 18 h bei 37°C konnte eine Auswertung erfolgen. Die Interpretation erfolgte anhand der in Tabelle 5 angegebenen Interpretationsstandards.

## 2.2 Asservierung der Isolate

Von jedem ESBL-/Carbapenemase-bestätigten oder AmpC-verdächtigen Isolat wurde zur Asservierung eine Kolonie mit einer sterilen Öse vom BAP aufgenommen und in 3 ml Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium gegeben. Daran schloss sich eine Inkubation auf dem Schüttler (160 rpm) für 4 h bei 37°C an. Mit dem Photometer wurde die OD gemessen. Lag diese bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,6 und 1, wurden 500 µl der Suspension zusammen mit 500 µl BHI-Medium + 60 % Glycerin in ein steriles Kryoröhrchen gegeben und gut vermischt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Isolate bei -70°C als Glycerinstocks aufbewahrt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurde das Master Pure DNA Blut Kit von der Firma Epicentre Biotechnologies verwendet. Nach Anzucht der Isolate auf BAP wurde eine üN-Kultur hergestellt, indem 1 Kolonie mit einer sterilen Öse in 3 ml NB-I-Medium gegeben und auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert wurde. Ein Milliliter dieser üN-Kultur wurde dann in ein 1,5 ml safe lock-Tube überführt und bei 9000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µl *Tissue & Cell Lysis Solution* vollständig resuspendiert. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 80°C für 5 min. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden zu jeder Probe 3 µl Ribonuclease A (Konz. 2 ng/ml) gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 20-60 min bei 37°C. Danach wurde bis zum Erhalt des Pellets nach Protokoll des Herstellers verfahren. Nach einer Trocknungszeit des Pellets von 2-3 h bei Raumtemperatur (RT) konnte die gewonnene DNA in 200 µl Aqua bidest (A. bidest) resuspendiert werden. Die Konzentration wurde mithilfe des NanoDrops gemessen. Alle DNA-Konzentrate wurden auf 50 ng/µl verdünnt. Diese Gebrauchslösungen wurden bei 4°C, die Konzentrate bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis von  $\beta$ -Laktamase- und Fluorchinolonresistenz (FQR)- Genen erfolgte durch Mono- und Multiplex (MP)-PCRs und wurde mit allen phänotypisch als ESBL-/Carbapenemase-bildend bzw. AmpC-verdächtig identifizierten Isolaten durchgeführt. Für alle PCRs wurde als Bestandteil des Mastermixes der sogenannte „Mix 20“ eingesetzt. Die-

ser bestand aus 1150 µl A. bidest, 150 µl 10x Dream Taq Green Buffer und 20 µl dNTPs (0,2 mM). Das sich daraus ergebende Gesamtvolumen lag bei 1320 µl.

Folgender Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 30 µl) wurde für die Monoplex-PCRs (mit Ausnahme der *bla*<sub>TEM</sub>-PCR) und für die AmpC-MP-PCR verwendet:

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Monoplex-PCRs**

Reagenz	Volumen	Hersteller
Mix 20	28,85 µl	s. 2.3.2 und Tabelle 37
Primer-F (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
Primer-R (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	Fermentas GmbH

Alle in den PCRs verwendeten und in Tabelle 40 im Anhang gelisteten Primer wurden auf eine Konzentration von 0,2 µM eingestellt. Folgender Reaktionsansatz wurde bei den MP-PCRs (mit Ausnahme der AmpC-MP-PCR) und bei der *bla*<sub>TEM</sub>-Monoplex-PCR eingesetzt:

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Multiplex-PCRs**

Reagenz	Volumen	Hersteller
Mix 20	15,60 µl	s. 2.3.2 und Tabelle 37
Primermix (100 pmol/µl)	0,25 µl	Eurofins Genomics
DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	Fermentas GmbH

Den Reaktionsansätzen wurden jeweils 5 µl Template-DNA (50 ng/µl) hinzugefügt (s. 2.3.1). Im Anschluss wurden alle Ansätze kurz in einer Tischzentrifuge bei 9000 rpm anzentrifugiert.

Folgendes Standard-Temperaturprofil wurde für die Durchführung der PCRs verwendet:

Phase	Temperatur	Dauer
Initialdenaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	s. Tabelle 8	30 sec
Elongation	72°C	1 min
Endelongation	72°C	10 min
Pause	10°C	∞

Die Annealing-Temperaturen sowie die Anzahl der Zyklen werden aufgrund ihrer Unterschiede gesondert in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Angaben zu den Annealing-Temperaturen und der Anzahl der Zyklen der Mono- und Multiplex-PCRs**

Bezeichnung PCR	Annealing-Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
CTX-M-Gruppe 1-Seq-1 („CTX-M-kurz“)	52	30
CTX-M-Gruppe 1-Seq-2 („CTX-M-lang“)	50	30
CTX-M-Gruppe 1	55	25
CTX-M-Gruppe 2	66	25
CTX-M-Gruppe 9	62	25
CTX-M-Gruppe 8/25/26	58	25
CTX-M-Gruppe 9-Sequenzierung	59	30
SHV-Monoplex	59	30
TEM-Monoplex	53	25
OXA-Gruppen-Multiplex	58	25
PER/GES/VEB-Multiplex	60	30
AmpC-Multiplex	60	30
AmpC-Promotor-PCR	58	25
Carbapenemasen-Multiplex	56	30
Aac(6')-Ib-Monoplex	56	30
QnrA/B/S-Multiplex	51	25
FQR-I-Multiplex	58	25
FQR-II-Multiplex	55	25
ParA/TraU/RepA-Monoplex	53	30
Bfp-Monoplex	62,5	30

Zur Bestimmung des CTX-M-Typs wurde bei phänotypisch als ESBL-Bildner identifizierten Isolaten zuerst die PCR „CTX-M-Gruppe 1-Seq-1“ durchgeführt. Ergab sich ein Amplifikat, wurde auch die PCR „CTX-M-Gruppe 1-Seq-2“ durchgeführt, sodass das gesamte CTX-M-Gen sequenziert werden konnte. Ergab sich jedoch kein Amplifikat, wurde das eventuelle Vorhandensein der übrigen CTX-M-Gruppen mittels der CTX-M-Gruppen-PCRs überprüft. Zusätzlich wurden alle Isolate auf das Vorhandensein einer SHV-ESBL und einer AmpC mittels der o.g. PCRs untersucht. Wies ein Isolat weder eine CTX-M- noch eine SHV-ESBL oder eine AmpC auf, wurden zusätzlich die TEM-Monoplex- und die PER/GEB/VES-MP-PCR durchgeführt. Bei AmpC-verdächtigen Isolaten wurde in vergleichbaren Fällen zusätzlich die AmpC-Promotor-PCR durchgeführt.

### 2.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Sichtbarmachung der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die PCR die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein 1,5 %iges Gel wurden 0,9 g Agarose in 60 ml 1x TAE-Puffer solange in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden war. Nach Abkühlen der Lösung auf 55°C wurden 0,6 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Im Anschluss wurde die flüssige Agarose in einen Gelgießstand gegossen, in der sich ein Proben-

taschenkamm mit 18 Kammern befand. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer, die zuvor mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde, gelegt. In die erste Tasche wurden 5 µl des Markers, in jede weitere Tasche jeweils 5 µl des PCR-Produkts pipettiert. Danach wurde eine Spannung von 120 V für 45 - 50 min angelegt. Nach Ablauf der Laufzeit erfolgte die Sichtbarmachung der DNA- Banden mittels Transilluminator.

### 2.3.2.2 Sequenzanalyse

Die genaue Typermittlung der  $\beta$ -Laktamase-Gene ist u. a. wichtig für die Unterscheidung ESB $\beta$ /non-ESB $\beta$ . Da mittels PCR oftmals eine exakte Bestimmung des ESB $\beta$ -, aber auch des Amp $\beta$ C- oder FQR-Typs nicht möglich ist, wurde das entsprechende PCR-Amplifikat zu der Firma LGC Genomics, Berlin, zur Sequenzierung geschickt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mithilfe des BLAST Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) mit vorhandenen Datenbankeinträgen verglichen und ausgewertet. Bei CTX-M-Sequenzen erfolgte die Auswertung mithilfe des Programms RidomSeqSphere®, in das die aktuell zur Verfügung stehenden Nukleotidsequenzen der CTX-M-Typen zuvor als Referenz-Datenbank hinterlegt wurden (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

### 2.3.2.3 Bestimmung der Ciprofloxacin-resistenten Variante von *aac(6')-Ib*

Die für die *aac(6')-Ib*-PCR benutzten Primer amplifizieren eine Vielzahl von *aac(6')-Ib*-Varianten. Ob es sich um eine Variante handelt, die für eine verringerte Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin kodiert (*cr*-Variante), kann durch den Verdau des PCR-Amplikates mit dem Restriktionsenzym BseGI bestimmt werden. Dazu wurde zunächst die PCR durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 9 beschrieben zusammen.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die *aac(6')-Ib*-PCR**

Reagenz	Volumen	Hersteller
Mix 20	19 µl	s. 2.3.2 und Tabelle 37
Primer-F (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
Primer-R (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	Fermentas GmbH
DNA-Template (50 ng/µl)	5 µl	

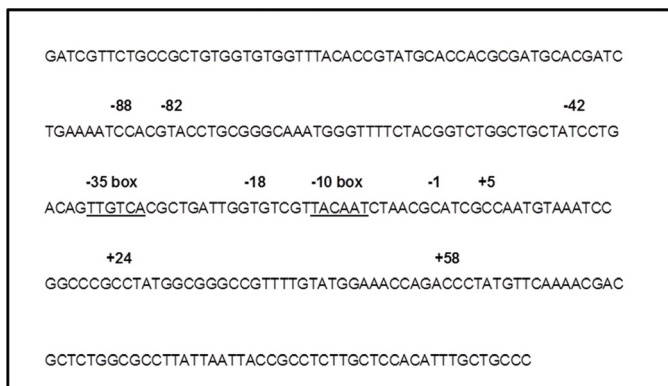
Die PCR lief nach dem unter 2.3.2. genannten Standard-Temperaturprofil ab; die Annealing-Temperatur und die Zyklusanzahl sind in Tabelle 8 gelistet.

Nach Durchführung der PCR wurde das PCR-Amplifikat verdaut. Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Tango-Puffer (10 x) und 0,075 µl der Restriktionsendonuklease BseGI (10 U/µl) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit A. bidest aufgefüllt. Nach Ablauf einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C wurde wie unter 2.3.2.1 beschrieben verfahren.



### 2.3.2.4 AmpC-Promotor-PCR

Um bei *E. coli*-Isolaten, die im ESBL-Bestätigungstest einen AmpC-verdächtigen Phänotyp zeigten, bei denen aber weder ein ESBL- noch ein AmpC-Gen gefunden werden konnte, eine eventuelle Mutation im AmpC-Promotor nachzuweisen, wurde zunächst der AmpC-Promotorbereich mittels PCR amplifiziert. Es wurde der Reaktionsansatz für Monoplex-PCRs (s. Tabelle 6), ein Standard-Temperaturprofil (2.3.2) sowie die in Tabelle 40 gelisteten Primer verwendet. Die PCR-Produkte wurden sowohl mit dem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärtsprimer sequenziert (LGC Genomics, Berlin). Die Sequenzanalyse wurde mithilfe des Programms RidomSeqSphere® durchgeführt. Als Referenzsequenz diente dabei die unter Abbildung 2 genannte Sequenz der AmpC-Promotor-Region eines *E. coli* K-12-Stammes (Accession-Nummer: AICK00000000).



**Abbildung 2: Sequenz der AmpC-Promotor-Region des *E. coli* K-12 [238]**

## 2.3.3 PCR-Nachweis virulenzassoziierter Gene bei *E. coli*

### 2.3.3.1 Multiplex-PCRs zum Nachweis virulenzassoziierter Gene

Zehn unterschiedliche MP-PCRs dienen dem Nachweis von 59 verschiedenen VAGs bei *E. coli*. Sie beinhalten sowohl Virulenzgene intestinal pathogener *E. coli* (InPEC) als auch extraintestinal pathogener *E. coli* (ExPEC). Die verwendeten Primer und die biologische Funktion sind in der Tabelle 44 im Anhang gelistet. Die MP-PCRs wurden nach folgendem Protokoll angesetzt:

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Multiplex-PCRs I-IX**  
(Tabelle 44)

	MP I-IV	MP V	MP VI (b+c)	MP VII	MP VIII	MP IX
<b>A. bidest</b>	14,06 µl	18,88 µl	18,56 µl	19,00 µl	18,95 µl	13,28 µl
<b>10x Dream Taq Green Buffer</b>	2,0 µl	2,50 µl	2,50 µl	2,50 µl	2,50 µl	2,0 µl
<b>dNTPs (0,2 mM)</b>	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
<b>Primer-Mix (100 pmol/µl)</b>	0,6 µl	0,3 µl	0,6 µl	0,2 µl	0,25 µl	0,4 µl
<b>DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)</b>	0,14 µl	0,12 µl	0,14 µl	0,10 µl	0,10 µl	0,12 µl
<b>DNA-Template (50 ng/µl)</b>	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	4,0 µl

Nach dem Anzentrifugieren der Proben erfolgte die Durchführung der PCR nach folgenden Temperaturprofilen:

Phase	PCR	Temperatur	Dauer
<b>Initialdenaturierung</b>	MP I-IX	94°C	3 min
<b>Denaturierung</b>	MP I-IX	94°C	30 sec
<b>Annealing</b>	MP I-IV	58°C	30 sec
	MP V-IX	57°C	30 sec
<b>Elongation</b>	MP I-IV	68°C	3 min
	MP V-VII+IX	68°C	1,5 min
	MP VIII	72°C	2 min
<b>Endelongation</b>	MP I-IX	72°C	10 min
<b>Pause</b>	MP I-IX	10°C	∞

Im Anschluss wurde die Agarose-Gelelektrophorese wie unter 2.3.2.1 beschrieben durchgeführt.

**2.3.3.2    Modifizierte Bosworth-PCR**

Die nach den Autoren benannte Bosworth-PCR dient dem Nachweis der Gene für neun Virulenzfaktoren, die mit schweinepathogenen *E. coli*-Isolaten assoziiert werden. Zu diesen Virulenzfaktoren zählen neben fünf Fimbrientypen (F4, F5, F41, F18 und F6) auch vier Toxine (hitzelabiles Enterotoxin LT-Ib, hitzestabiles Enterotoxin ST-Ia, hitzestabiles Enterotoxin ST-II, Shigatoxin 2e) [239]. Barth *et al.* fügten ein Primerpaar hinzu, mit dem der Nachweis eines weiteren wichtigen Adhäsins, dem Intimin, möglich ist [240]. Die verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 45 gelistet. Um typische von atypischen EPEC unterscheiden zu können, wurde von allen Intimin-positiven *E. coli*-Isolaten zusätzlich eine Monoplex-PCR (Protokoll s. Tabelle 6) zum Nachweis von Bundle forming pili (bfp) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind ebenfalls in Tabelle 44 gelistet.


**Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bosworth-PCR modifiziert nach Barth *et al.* [240]**

Reagenz	Volumen	Hersteller
<b>A. bidest</b>	16,80 µl	
<b>10x Dream Taq Green Buffer</b>	3,0 µl	Fermentas GmbH
<b>MultiPrimer-Mix I<sup>1</sup> (je 5 pmol/µl)</b>	3,0 µl	Eurofins Genomics
<b>MultiPrimer-Mix II<sup>2</sup> (je 5 pmol/µl)</b>	3,0 µl	Eurofins Genomics
<b>dNTPs (0,2 mM)</b>	1,0 µl	PAN-BIOTECH GmbH
<b>DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)</b>	0,2 µl	Fermentas GmbH
<b>DNA-Template (50 ng/µl)</b>	3,0 µl	

1) MultiPrimer-Mix-I: F5\_f, F5\_r, F18\_f, elt\_f, F6\_f, F6\_r, F4\_f, F4\_r, estb\_f, F-EaeA\_f

2) MultiPrimer-Mix II: estap\_f, estap\_r, F18\_r, elt\_r, F41\_f, F41\_r, Stx2e\_f, Stx-2e\_r, estb\_r, F-EaeA\_r

Nach dem Anzentrifugieren der Proben erfolgte die Durchführung der PCR nach folgendem Temperaturprofil:

Phase	Temperatur	Dauer
<b>Initialdenaturierung</b>	94°C	5 min
 <b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec
<b>35x Annealing</b>	55°C	30 sec
<b>Elongation</b>	72°C	1 min
<b>Endelongation</b>	72°C	5 min
<b>Pause</b>	10°C	∞

Im Anschluss wurde die Agarose-Gelelektrophorese wie unter 2.3.2.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.3.3.3 PCR zum Nachweis virulenzassoziierter Gene bei *E. coli*-Isolaten von Rindern

Die nach van Bost [241], Franck [242] und Nguyen [243] modifizierte PCR dient dem Nachweis der Gene für neun Virulenzfaktoren, die mit den für Rinder pathogenen *E. coli*-Pathovaren ETEC, STEC und NTEC assoziiert werden. Dazu zählen neben Adhäsinen (F17-, F41 und P-Fimbrien) und Toxinen (Shigatoxin 1 und 2, hitzestabiles Enterotoxin ST-I) auch ein Eisenaufnahmesystem (*iucD*) und der zytotoxisch nekrotisierende Faktor Typ 1 und Typ 2. Die verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 46 gelistet.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der PCR zum Nachweis von VAGs bei *E. coli*- Isolaten von Rindern modifiziert nach van Bost, Franck und Nguyen [241-243]**

Reagenz	Volumen	Hersteller
<b>A. bidest</b>	19,80 µl	
<b>10x Dream Taq Green Buffer</b>	3,0 µl	Fermentas GmbH
<b>MultiPrimer-Mix<sup>1,2</sup></b>	3,0 µl	Eurofins Genomics
<b>dNTPs (0,2 mM)</b>	1,0 µl	PAN-BIOTECH GmbH
<b>DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)</b>	0,2 µl	Fermentas GmbH
<b>DNA-Template (50 ng/µl)</b>	3,0 µl	

- 1) iucD-for, iucD-rev, F-Eae-1\_f, F-Eae-2\_f, F-F41-3\_f, F-F41-4\_r, F-Sta-1\_f, F-Sta-2\_r, f17A-for, f17A-rev, papC-for, papC-rev, VT2-for, VT2-rev: je 2,5 pmol/µl
- 2) cnf1/2-for, cnf1/2-rev, VT1-for, VT1-rev: je 5 pmol/µl

Nach dem Anzentrifugieren der Proben erfolgte die Durchführung der PCR nach folgendem Temperaturprofil:

Phase	Temperatur	Dauer
<b>Initialdenaturierung</b>	94°C	5 min
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec
<b>Annealing</b>	57°C	30 sec
<b>Elongation</b>	72°C	1 min 30 sec
<b>Endelongation</b>	72°C	5 min
<b>Endphase</b>	10°C	∞



Im Anschluss wurde die Agarose-Gelelektrophorese wie unter 2.3.2.1 beschrieben durchgeführt.

## 2.3.4 Phylogenetische Untersuchungen

### 2.3.4.1 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

In dieser Arbeit wurde die *E. coli*-MLST nach Wirth *et al.* durchgeführt [244]. Sie basiert auf der Analyse der Haushaltsgene *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA*. Eine Datenbank mit allen bisher existierenden Allelen und ST wird von der University of Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) gepflegt. Für *K. pneumoniae* wurden die von Diancourt *et al.* definierten Haushaltsgene *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* und *tonB* verwendet [214]. Auch hier ermöglicht eine Online-Datenbank einen schnellen Abgleich der Analysedaten (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Für *K. oxytoca* wurde erst nach dem Abschluss der praktischen Arbeiten ein MLST-Schema entwickelt, das in dieser Arbeit keine Anwendung findet.

Sowohl für die *K. pneumoniae*- als auch für die *E. coli*- Isolate wurde der in Tabelle 13 angegebene Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 60 µl eingesetzt. Die Primer für die jewei-

lige MLST wurden den oben genannten Publikationen entnommen (s. Tabelle 41). Nachdem der Mastermix zu jeweils 5 µl DNA gegeben wurde, erfolgte die Durchführung der PCR nach folgendem Temperaturprofil:

Phase	Temperatur	Dauer
Initialdenaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
35 x Annealing	<i>E. coli</i> : 56°C	30 sec
	<i>K. pneumoniae</i> : 50°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min
Endelongation	72°C	10 min
Pause	10°C	∞

**Tabelle 13: Ansatz Mastermix für die *E. coli*- und *K. pneumoniae*-MLST**

Reagenz	Volumen	Hersteller
Mix 20	58,85 µl	s. 2.3.2 und Tabelle 37
Primer-F (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
Primer-R (10 pmol/µl)	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	Fermentas GmbH
DNA-Template (50 ng/µl)	5,0 µl	

Nach Ablauf des PCR-Programms wurden die Proben auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 45 min laufen gelassen. Die Banden wurden anschließend mittels Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Die PCR-Produkte konnten danach zur Sequenzierung an die Firma LGC Genomics, Berlin, geschickt werden. Die Sequenzdaten wurden mithilfe des Programms Ridom SeqShere® (Version 1.0.1, Ridom® GmbH, Münster) ausgewertet, um den ST zu erhalten.

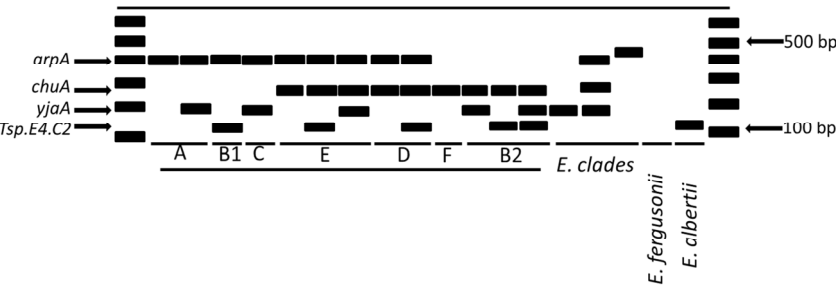
#### **2.3.4.2 Einteilung der *E. coli*-Isolate in phylogenetische Gruppen mittels PCR**

Die für die von Clermont *et al.* [138] entwickelte PCR zur Einteilung von *E. coli*-Isolaten in phylogenetische Gruppen verwendeten Primer sind in Tabelle 42 im Anhang zu finden. Folgender Reaktionsansatz wurde zur Durchführung der Quadruplex-PCR benutzt:

**Tabelle 14: Mastermix Quadruplex-PCR zur Einteilung der *E. coli*-Isolate in phylogenetische Gruppen**

Reagenz	Volumen	Hersteller
<b>A. bidest</b>	16,50 µl	
<b>10x Dream Taq Green Buffer</b>	4,5 µl	Fermentas GmbH
<b>dNTPs (0,2 mM)</b>	0,5 µl	PAN-BIOTECH GmbH
<b>Primer-F (10 pmol/µl)</b>	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
<b>Primer-R (10 pmol/µl)</b>	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
<b>DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)</b>	0,15 µl	Fermentas GmbH
<b>DNA-Template (50 ng/µl)</b>	5,0 µl	

Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem unter 2.3.2 genannten Temperaturprofil bei einer Annealing-Temperatur von 59°C mit 25 Wiederholungen. Im Anschluss erfolgte die Agarose-Gelelektrophorese wie unter 2.3.2.1 beschrieben. Folgendes Schema wurde zur Auswertung der Quadruplex-PCR benutzt:



**Abbildung 3: Quadruplex-PCR-Profile der Phylo-Typisierungsmethode modifiziert nach [138]**

Die Genkombination *arpA* und *yjaA* kann sowohl für die Gruppe A als auch für die Gruppe C stehen. Auch die Genkombinationen *arpA*, *chuA* und *TspE4.C2* und *arpA* und *chuA* ergeben sowohl eine Zuordnungsmöglichkeit zur Gruppe E als auch zur Gruppe D. In diesen Fällen ist es nötig, eine weitere PCR zur endgültigen Bestimmung der phylogenetischen Gruppe durchzuführen. Die benötigten Primer sind in Tabelle 42 im Anhang gelistet. Die Durchführung der PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 15: Reaktionsansatz C- bzw. E-Detektions-PCR**

Reagenz	Volumen	Hersteller
<b>A. bidest</b>	21,30 µl	
<b>10x Dream Taq Green Buffer</b>	3,0 µl	Fermentas GmbH
<b>dNTPs (0,2 mM)</b>	1,0 µl	PAN-BIOTECH GmbH,
<b>Primer-F (10 pmol/µl)</b>	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
<b>Primer-R (10 pmol/µl)</b>	je 0,5 µl	Eurofins Genomics
<b>DreamTaq Green Polymerase (5 U/µl)</b>	0,15 µl	Fermentas GmbH
<b>DNA-Template (50 ng/µl)</b>	5,0 µl	

Die Annealing-Temperatur betrug für die Gruppe E-Detektions-PCR 57°C und für die Gruppe C-Detektions-PCR 59°C. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte wie unter 2.3.2.1 beschrieben.

### 2.3.4.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Um die Klonalität der Isolate, die aus gleichen Tierbeständen stammten, zu überprüfen und um epidemiologische Zusammenhänge zwischen einzelnen Isolaten aufzudecken, wurde eine PFGE durchgeführt. Dazu wird das Genom mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease verdaut und anschließend mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die PFGE wurde wie von Ewers *et al.* beschrieben durchgeführt [191]. Es wurde eine flüssige üN-Kultur (s. 2.3.1) hergestellt, die am nächsten Tag auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt und für die benötigte Verdünnung rechnerisch bestimmt wurde. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden zu dem Endvolumen von 250 µl 375 µl 1,2 %ige Gold-Agarose hinzugegeben und vermischt. Von dem Gemisch wurden 100 µl in Blöckchenschablonen gegeben und für 15 min gekühlt. Die erstarrten Blöckchen wurden jeweils in ein 2 ml Reagiergefäß gegeben und nach Zugabe von 0,9 mg Proteinase K und 500 µl ESP-Puffer über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K-Lösung abpipettiert und durch dreimaliges Waschen der Blöckchen in jeweils 1 ml 1x TE-Puffer für 45 min im Oberkopfschüttler bei RT inaktiviert.

Die in den Blöckchen enthaltene DNA wurde durch das Restriktionsenzym XbaI verdaut. Dazu wurde zuerst jedes Blöckchen halbiert und eine Hälfte mit 150 µl Tango Puffer (1x) durch eine 30-minütige Inkubation bei RT äquilibriert. Danach wurde der Puffer abpipettiert und das halbe Blöckchen mit 150 µl Tango-Puffer (1x) und 2 µl XbaI versetzt. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C wurden das Enzym und der Puffer abpipettiert und der Verdau durch Hinzugeben von 0,5 ml 1x TE-Puffer gestoppt. Die Blöckchen wurden mithilfe eines Spatels in die Taschen eines 1,2 %igen PFGE-Gels gegeben und jede Tasche anschließend mit flüssiger Agarose verschlossen. Jeweils in die erste, in die mittlere und in die letzte Tasche wurde der Midrange PFG-Marker gegeben und anschließend ebenfalls mit Agarose verschlossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im BIO-RAD Chef- Mapper III in

0,5x TBE-Puffer nach folgenden Bedingungen: Laufzeit: 20,5 h; Temperatur: 14°C; Pulszeiten: 5-50 sec.; Winkel: 120°; Spannung: 6 Volt.

Nach Ablauf der Laufzeit wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad (4 mg/L) für 30 min gefärbt und anschließend im Transilluminator visualisiert und fotografiert. Die Analyse der Bandenmuster erfolgte mit Hilfe des Programms BioNumerics (Software Package 6.6 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien).

Die Auswertung und die epidemiologische Einordnung der PFGE-Restriktionsmuster erfolgten nach Tenover *et al.* [245]. Die Anwendung dieses Auswertungsschemas setzt voraus, dass die Isolate, die miteinander verglichen werden sollen, in einem zeitlichen und räumlichen Zusammenhang stehen, wie es z. B. im Rahmen eines Ausbruchgeschehens der Fall ist. Zeigen die Isolate dasselbe Restriktionsmuster und besitzen die gleiche Anzahl an Banden derselben Größe, sind sie identisch. Unterscheiden sie sich in zwei oder drei Banden, gelten die Isolate mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als nah verwandt und bilden eine Subpopulation. Bei zwei voneinander unabhängigen genetischen Vorfällen, was in der Regel einer Variation von vier bis sechs Banden im Restriktionsmuster entspricht, sind sie möglicherweise verwandt. Bei einer noch höheren Abweichung gelten die Stämme als nicht verwandt.

## **2.3.5 Charakterisierung der Resistenzgen-tragenden Plasmide**

### **2.3.5.1 S1-Nuclease-Verdau mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese zur Größenbestimmung von Resistenzplasmiden**

Die Durchführung dieser Methode dient der Größenbestimmung von bakteriellen Plasmiden. Durch die Behandlung mit S1-Nuclease werden die Plasmide zunächst linearisiert und dann zur Auftrennung einer PFGE wie unter 2.3.4.3 beschrieben unterzogen.

Von den auf BAP vorliegenden zu untersuchenden Stämmen wurden 3-4 Kolonien in 1,5 ml CSP-Puffer gegeben, die OD<sub>450</sub> gemessen und auf einen Bereich von 0,25-0,35 eingestellt. 300 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend mit 15 µl einer Proteinase K-Lösung (Konz. 20 mg/ml) vermengt und kurz bei 37°C im Thermocycler erwärmt. 315 µl 1,0 %ige Gold-Agarose wurden dazugegeben, gemischt und luftblasenfrei in Blöckchenschablonen gefüllt. Nach einer Abkühlzeit von 10-15 min wurden die Blöckchen einzeln in jeweils 5 ml Lysepuffer versetzt mit 25 µl der Proteinase K-Lösung gegeben und für 3 h im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden die Blöckchen bei RT mit 200 µl S1-Puffer (Verdünnung 1:10) für 20 min äquilibriert. Der Puffer wurde danach abgenommen und durch mit 8 U der S1-Nuclease versetzten frischen Puffer (100 µl) ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37°C. Der Verdau wurde mit 10 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die Blöckchen und ein als Marker dienendes, zuvor mit XbaI verdautes *Salmonella* Braenderup-Isolat wur-



den anschließend vorsichtig mithilfe eines Spatels in die Taschen eines 1 %igen Pulsed Field Certified-Agarosegels gegeben und jede Tasche anschließend mit flüssiger Agarose verschlossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im BIO-RAD Chef- Mapper III in 0,5x TBE-Puffer nach folgenden Bedingungen: Laufzeit: 20 h; Temperatur: 14°C; Pulszeiten: 1-25 sec.; Winkel: 120°; Spannung: 6 Volt.

Nach Ablauf der Laufzeit wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad (4 mg/L) für 30 min gefärbt und anschließend im Transilluminator visualisiert und fotografiert.

### 2.3.5.2 Plasmidpräparation

Mithilfe der Plasmidpräparation kann Plasmid-DNA aus Bakterien extrahiert und im Agarosegel dargestellt werden. Dazu wurden von einer flüssigen üN-Kultur (s. 2.3.1) 1,4 ml in ein safe-lock-Eppendorfgefäß überführt und für 4 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 100 µl Lysepuffer versetzt. Durch 3-4-maliges Stürzen des Gefäßes wurde eine gute Vermischung erreicht. Die Inkubation erfolgte im Anschluss im Wasserbad für 25 min bei 58°C. Danach wurden zu dem Lysat 100 µl eines 1:1 Chloroform-/Phenolgemisches hinzugegeben und durch kräftiges Stürzen des Gefäßes (100 Wiederholungen) vermischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min. Aus der oberen Phase des sich ergebenden Zwei-Phasen-Gemischs, in der sich die extrahierten Plasmide befinden, wurden 90 µl abgenommen und in ein frisches Reagiergefäß überführt. Nachdem 20 µl Ladepuffer hinzugegeben wurden, konnte das Produkt auf ein 0,5 %iges Agarosegel aufgetragen werden. Die als Größenkontrolle dienenden Markerstämme (Tabelle 49) wurden ebenfalls gemäß dem Protokoll aufgearbeitet und auf das Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 70 Volt für ca. 16 h angelegt und das Gel nach Ablauf der Laufzeit im Ethidiumbromid-Bad für 30 min gefärbt. Die Plasmidbanden wurden mithilfe des Transilluminators sichtbar gemacht und fotografiert.

### 2.3.5.3 Transkonjugation von ESBL- bzw. Carbapenemase-Plasmiden in

#### *E. coli* K-12

Um das Potential der Übertragbarkeit der ESBL- bzw. Carbapenemase-Gene-tragenden Plasmide zu demonstrieren und zur Charakterisierung der Plasmide wurden diese *in vitro* in einen Rezipientenstamm übertragen. Als Rezipient fungierte der *E. coli* J53, ein Natriumazid-resistenter und plasmidnegativer *E. coli* K-12-Stamm (Tabelle 49). Von diesem und dem jeweiligen Donorstamm (Wildtyp (WT)-Stamm mit ESBL-/Carbapenemase-Plasmid) wurde eine flüssige üN-Kultur (s. 2.3.1) hergestellt. Anschließend wurden 100 µl beider üN-Kulturen in jeweils 3 ml frisches NB-I-Medium gegeben und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen gelassen. Von diesen eingestellten Kulturen wurden 100 µl des Rezipientenstamms und 200 µl des Donorstamms auf ein ca. 6 x 6 cm großes, steriles Filterpa-

pier (Blotting-Papier) gegeben, das zuvor mithilfe einer sterilen Pinzette auf eine MH-Agar Platte gelegt worden war. Die Platten wurden im Anschluss bei 37°C üN inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Filterpapier mit einer sterilen Pinzette abgenommen und in 5-10 ml PBS gewaschen. 100 µl der sich daraus ergebenden Suspension wurden mithilfe eines Einmalspatels auf Endoagar, der mit Natriumazid und entweder Cefotaxim (4 mg/l) im Fall von ESBL-Bildnern oder Ampicillin (50 mg/l) im Fall von Carbapenemase-Bildnern versetzt war, ausplattiert. Nach einer erneuten üN-Bebrütung bei 37°C konnten am darauffolgenden Tag Einzelkolonien gepickt und mithilfe einer PCR auf das ESBL- bzw. Carbapenemase-Gen überprüft werden. Im weiteren Verlauf wurde der Übergang des Plasmids durch einen S1-Nuclease-Verdau mit anschließender PFGE (s. 2.3.4.3) bestätigt und die MHK-Werte mittels VITEK 2 überprüft (s. 2.1.5.2).

#### **2.3.5.4 Herstellung Carbapenemase-Plasmid freier Varianten von *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämmen**

Die Herstellung von Varianten ohne Carbapenemase-Plasmid erfolgte in zwei separaten Ansätzen nach dem Protokoll von Schaufler *et al.* [246]. In beiden Fällen wurden die jeweiligen Isolate zuerst aus der Glycerinkultur auf BAP angezüchtet und üN bebrütet. Am nächsten Tag wurden flüssige üN-Kulturen hergestellt, indem je eine Kolonie mit einer sterilen Öse in 5 ml Lysogeny-Broth (LB)-Medium und in 5 ml BHI-Medium gegeben wurde. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C wurden jeweils 100 µl der üN-Kulturen in frische 5 ml des entsprechenden Mediums gegeben. Zu dem beimpften LB-Medium wurden zusätzlich 100 µl einer replikationshemmenden Acridinorangelösung gegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37°C für 24 h. Um die Bakterien physiologischem Stress auszusetzen wurde das beimpfte BHI-Medium für 24 h bei 43°C inkubiert [246]. Diese Vorgänge wurden täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen wiederholt.

Um den Verlust des Carbapenemase-Plasmids zu überprüfen, wurden die Stämme einmal wöchentlich auf BAP angezüchtet und die unter 2.1.3 beschriebene Screeningmethode durchgeführt. Wenn kein Wachstum erfolgte, wurde der Verlust des Plasmids mittels Plasmidpräparation und PCR auf das entsprechende Gen laut Protokoll bestätigt. Um auszuschließen, dass es durch die wiederholten Passagen zu einer Kontamination des Mediums gekommen ist, wurde mithilfe einer PFGE die klonale Identität der Carbapenemase-Plasmid freien Variante und des WT-Stamms überprüft. War diese gegeben, konnte die Carbapenemase-Plasmid freie Variante für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### 2.3.5.5 Replikon-Typisierung

In dieser Arbeit wurde zur Eingruppierung der Plasmide in die Inc-Gruppen das „PCR-based replicon typing kit“ (PBRT) der Firma Diatheva verwendet [120]. Das Kit enthält alle für die Durchführung notwendigen Lösungen, Primer und Kontrollstämme. Es basiert auf dem Nachweis gruppenspezifischer Replikons mittels fünf Multiplex- und drei Simplex-PCRs. Das Kit wurde laut Herstellerangaben verwendet.

### 2.3.5.6 PCR zum Nachweis von Genregionen auf dem OXA-48-Plasmid

Das PBRT-Kit erwies sich zum Zeitpunkt der Untersuchungen als ungeeignet um OXA-48-Plasmide, die i. d. R. dem IncL/M-Typ zugeordnet werden, zu klassifizieren. *Poirel* et al. publizierten daraufhin drei Primerpaare (s. Tabelle 43), die Teile von konservierten Genregionen (*repA*, *traU*, und *parA*) des OXA-48-Plasmids amplifizieren [132]. Die einzelnen Gene wurden mittels Monoplex-PCRs wie unter 2.3.2 beschrieben nachgewiesen. Annealing-Temperaturen und Zyklusanzahl sind in Tabelle 8 gelistet.

## 2.4 Untersuchungen zur Biofilmbildung bei Carbapenemase-Bildnern

### 2.4.1 Kristallviolett-Mikrotiterplattentest

Ob die Fähigkeit zu einer Biofilmbildung bei den Carbapenemase-produzierenden Isolaten vorhanden ist und inwieweit diese von dem Carbapenemase-Gen tragenden Plasmid beeinflusst wird, wurde mithilfe eines Kristallviolett-Mikrotiterplattentests (KV-MTP-Test) untersucht. Dazu wurden die zu untersuchenden Isolate von der Glycerinkultur auf BAP angeimpft und üN bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden je weils einige Kolonien gepickt und sowohl in 5 ml LB-Medium als auch in 5 ml M63-Minimalmedium gegeben. Es erfolgte eine Inkubation üN bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (150 rpm). Die üN-Kulturen wurden am nächsten Tag je nach Anzuchtmedium in LB- oder in M63-Minimalmedium 1:10 verdünnt und die OD<sub>600</sub> am Photometer bestimmt. Durch weitere Verdünnungen wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt. Jeweils 200 µl-Aliquots dieser Verdünnungen wurden in 6-facher Ausführung in zwei 96-well Rotilabo-Microtest-Platten gegeben und die Platten mit luftdurchlässiger Folie verschlossen. Eine Platte wurde anschließend für 24 h, die andere für 48 h bei 28°C ohne Schütteln inkubiert. Bei der 24-h-Platte wurde nach Ablauf der Inkubationszeit die OD<sub>595 nm</sub> bestimmt. Das Medium wurde abpipettiert und die Platte dreimal mit jeweils 300 µl destilliertem Wasser gewaschen, um planktonische Zellen zu entfernen. Nach einer Lufttrocknung wurde in jede Vertiefung 250 µl 99 %iges Methanol, das der Fixierung der an der Oberfläche haftenden Bakterien dient, gegeben und 15 min bei RT stehengelassen. Anschließend wurde das Methanol abpipettiert und die Platte erneut luftgetrocknet. In jede Vertiefung wurden da-

nach 250 µl 0,1 %iges KV gegeben und die Bakterien für 30 min gefärbt. Nach Abnahme der Färbelösung erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit jeweils 300 µl destilliertem Wasser mit anschließender Lufttrocknung. Nach Zugabe von 300 µl eines Ethanol-Aceton-Gemischs (Verhältnis 80:20) wurde die Platte für 30-45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 rpm geschüttelt, um die Färbung vollständig in Lösung zu bringen. Die Absorption der KV-Färbung wurde bei der Wellenlänge 570 nm im Microplate-Reader gemessen.

Mit der 48-h-Platte wurde nach Ablauf der Inkubationszeit ebenso wie oben beschrieben verfahren. Als Negativkontrolle wurde der Stamm AAEC189 (IHIT24620), der sowohl in LB- als auch in M63-Medium keine Biofilmbildung zeigt, und als Positivkontrollen die Stämme W3110 (IHIT24619) und IMT12041 (IHIT26347) (Tabelle 49) mitgeführt.

Zur Auswertung der Daten wurde die Bildung von Biofilmen relativ zum Wachstum von Bakterien mithilfe folgender Formel berechnet [247]:

$$\text{SBF} = \frac{\text{AB} - \text{CW}}{\text{G}}$$

SBF: specific biofilm formation

AB: OD570 nm der anhaftenden Bakterienzellen

CW: OD570 nm der nur Medium enthaltenden wells (=Leerwert)

G: OD595 nm des Bakterienwachstums nach Inkubation

### 2.4.2 Langzeitkolonien auf Spanagar

Mithilfe von Langzeitkolonien auf Spanagar kann die Fähigkeit von Bakterien zur Biofilmbildung auf einem festen Nährmedium beurteilt werden. Dafür wurden flüssige üN-Kulturen (s. 2.3.1) angelegt. Nach dem Trocknen der Spanagarplatten über eine Stunde unter der Sterilbank wurden je 2 µl der üN-Kulturen auf je zwei Spanagarplatten mit respektive ohne NaCl getropft. Nach Einziehen der Tropfen wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und jeweils eine Spanagarplatte mit und eine ohne NaCl bei 28°C bzw. bei 37°C für 10 Tage inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung durch Beurteilung der Morphologie der Makrokolonien und die Dokumentation mittels Stereomikroskop. Das Auftreten radiärer oder verzweigter Oberflächenstrukturen wurde als positives Ereignis gewertet, eine glatte Oberfläche hingegen wurde als negativ bewertet [248]. Als Positivkontrolle wurden die Stämme W3110 (IHIT 24619) und IMT26949 (IHIT24594) und als Negativkontrolle der Stamm AAEC189 (IHIT24620) (Tabelle 49) mitgeführt.

## 2.5 Statistische Auswertungen

Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Version 22 (IBM, Armonk; USA) durchgeführt. Zur statistischen Analyse des KV-MTP-Tests wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen verwendet. Zur statistischen Analyse

des Vorkommens von VAGs bei den verschiedenen phylogenetischen Gruppen bei *E. coli* wurde der Bonferroni-Test angewendet.

Die statistische Signifikanzgrenze für die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten ist mit  $(p) \leq 0,005$  definiert.

Bei der Angabe der Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

n.s. = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ); wird nicht dargestellt

\* = schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ )

\*\* = signifikant ( $p \leq 0,01$ )

\*\*\* = hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ )

## IV Ergebnisse

### 1. Herkunft der *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate

#### 1.1 Herkunft der *E. coli*-Isolate

Im genannten Zeitraum konnten 3582 *E. coli*-Isolate aus dem eingesandten klinischen Untersuchungsmaterial isoliert werden. Einsender waren neben den Kliniken und Einrichtungen des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen ca. 400 externe Tierarztpraxen und -kliniken aus ganz Deutschland. Die Herkunft der Isolate in Bezug auf Tierarten und Probenherkunft ist in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16: Verteilung der im Zeitraum vom 04.06.2012 bis 04.06.2013 gesammelten *E. coli* Isolate (n=3582)**

Probenherkunft	Anzahl n	% an Gesamtanzahl Isolate (n=3582)
<b>Probenmaterial</b>		
Genitaltrakt	529	14,8
Haut/Haare	78	2,2
Kot	1947	54,3
Magen-Darm-Trakt	246	6,9
Organe	266	7,4
Respirationstrakt	201	5,6
Urin	142	4
Wunden	104	2,9
Sonstiges Probenmaterial <sup>1</sup>	69	1,9
<b>Tierart</b>		
Hund	656	18,3
Katze	234	6,5
Schwein	1523	42,5
Pferd	540	15,1
Rind	340	9,5
Sonstige Tierarten <sup>2</sup>	289	8,1

1: Abdomen, Auge, Blutkulturen, Flosse, Gelenk, Gewebe, Knochen, Lymphknoten, Milch, Ohren, ZNS, Thorax

2: Esel, kleine Wiederkäuer, Nagetiere, Vögel, Zoo-/Wildtiere, Reptilien

Die Verteilung des Probenmaterials richtete sich nach dem eingesandten Untersuchungsgut und unterlag daher einem Bias, der bei der Konzeption der Arbeit einkalkuliert war.

Die Mehrzahl (1947/54,3 %) der *E. coli*-Isolate wurde aus Kotproben kultiviert, gefolgt von 529 *E. coli*-Isolaten aus dem Genitaltrakt (14,8 %). Niedrigere Zahlen ergaben sich für Isolate aus dem Wundbereich (104/2,9 %) und aus Haut- bzw. Haarproben (78/2,2 %). Die meisten Isolate stammten von Schweinen (1523/42,5 %) und von Hunden (656/18,3 %). 540 (15,1 %) *E. coli*-Isolate ließen sich in Probenmaterial von Pferden, 340 (9,5 %) in Untersuchungsmaterial von Rindern nachweisen. Die geringste Anzahl an *E. coli*-Isolaten stammte

von Katzen (234/6,5 %) und sonstigen Tieren (289/8,1 %) (Tabelle 16). Die hohe Anzahl an von Rindern und Schweinen und aus Kotproben stammenden *E. coli*-Isolaten ist der Tatsache geschuldet, dass das IHIT eine PCR-basierte Typisierung von *E. coli* aus Durchfallproblematiken bei diesen Tieren als diagnostische Dienstleistung anbietet und entsprechend viel Untersuchungsmaterial mit dieser Fragestellung eingeschickt wird. Insgesamt 1091 *E. coli*-Isolate stammten daher aus Kot von Schweinen, 175 *E. coli*-Isolate aus Kot von Rindern.

## 1.2 Herkunft der *Klebsiella* spp.- Isolate

Es konnten 457 *K. pneumoniae*- und 132 *K. oxytoca*-Isolate aus dem im genannten Zeitraum eingesandten Untersuchungsmaterial isoliert werden. Die Herkunft der Isolate in Bezug auf Tierarten und Probenmaterial ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Verteilung der im Zeitraum 04.06.2012 bis 04.02.2014 gesammelten *K. pneumoniae*- und *K. oxytoca*-Isolate**

Probenherkunft	<i>K. pneumoniae</i>		<i>K. oxytoca</i>	
	Anzahl n	% an Gesamtanzahl Isolate (n=457)	Anzahl n	% an Gesamtanzahl Isolate (n=132)
<b>Probenmaterial</b>				
Genitaltrakt	41	9,0	28	21,2
Haut/Haare	21	4,6	12	9,1
Kot	165	36,1	32	24,2
Magen-Darm-Trakt	24	5,2	2	1,5
Organe	63	13,8	18	13,6
Respirationstrakt	64	14,0	29	22,0
Urin	26	5,7	3	2,3
Wunden	25	5,5	2	1,5
Sonstiges Probenmaterial <sup>1</sup>	28	6,1	6	4,6
<b>Tierart</b>				
Hund	112	24,5	21	15,9
Katze	13	2,9	16	12,1
Schwein	187	40,9	26	19,7
Pferd	68	14,9	32	24,3
Rind	38	8,3	4	3,0
Sonstige Tierarten <sup>2</sup>	39	8,5	33	25

1: Abdomen, Auge, Blutkulturen, Knochen, Lymphknoten, Milch, Ohren, ZNS, Pericard

2: Esel, kleine Wiederkäuer, Nagetiere, Vögel, Zoo-/Wildtiere, Reptilien

Die Mehrzahl der *Klebsiella* spp.-Isolate (*K. pneumoniae*: 36,1 %, *K. oxytoca*: 24,2 %) stammte aufgrund der bereits o.g. im IHIT angebotenen Dienstleistung aus Kotproben, gefolgt von Isolaten aus Organmaterial (13,8 %/13,6 %), aus dem Respirationstrakt (14,0 %/22,0 %) und aus dem Genitaltrakt (9,0 %/21,2 %). Deutlich weniger Isolate konnten aus Haut- bzw. Haarproben (4,6 %/9,1 %), aus dem Magen-Darm-Trakt (5,2 %/1,5 %), aus

Urin (5,7 %/2,3 %), aus Wunden (5,5 %/1,5 %) und aus sonstigen Proben (6,1 %/4,6 %) kultiviert werden.

Im Fall von *K. pneumoniae* war wie bei *E. coli* die Tierart Schwein aufgrund der überdurchschnittlich großen Anzahl von Kotproben von Schweinen dominierend (40,9 %; *K. oxytoca* 19,7 %), die meisten *K. oxytoca*-Isolate (24,3 %; *K. pneumoniae* 14,9 %) konnten hingegen von Pferden isoliert werden. Weniger Isolate stammten bei beiden Spezies von Katzen (2,9 %/12,1 %) und Rindern (8,3 %/3,0 %). 25 % der isolierten *K. oxytoca*-Stämme stammten von Tieren, die unter „Sonstige Tierarten“ zusammengefasst wurden.

## **2. ESBL- und AmpC-bildende *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate**

### **2.1 Phänotypische Charakterisierung**

#### **2.1.1 Screening von *E. coli*-Isolaten auf reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen**

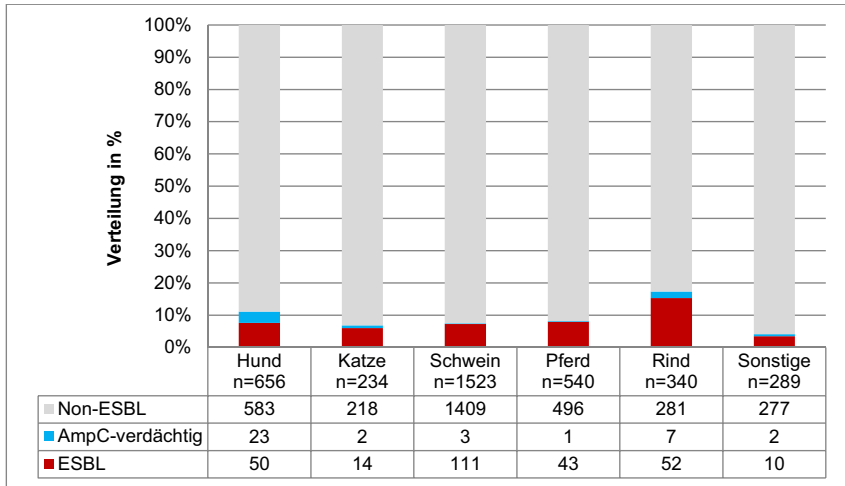
Alle 3582 *E. coli*-Isolate wurden mithilfe des „ESBL-Agars“ auf eine eventuell vorliegende reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen gescreent. 438 Isolate zeigten ein Wachstum auf dem „ESBL-Agar“ und galten somit als ESBL-/AmpC-verdächtig. Ein anschließender phänotypischer Bestätigungstest („confirmatory test“) wies 299 dieser Isolate als ESBL-Bildner aus, bei 45 Isolaten ergab sich ein Verdacht der AmpC-Bildung.

In einzelnen Fällen stammten mehrere ESBL-bildende bzw. AmpC-verdächtige Isolate aus demselben Tierbestand. Mittels PFGE wurden die entsprechenden Isolate auf Klonalität überprüft. Auf diese Weise identifizierte „copy“-Stämme wurden von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Nach Abzug der „copy“-Stämme ergab sich eine Anzahl von 280 phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten und 38 AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolaten (Abbildung 4).

Die meisten ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate wurden unter den von Schweinen stammenden Isolaten gefunden (n=111), gefolgt von den Rinder- (n=52), Hunde- (n=50), Pferde- (n=43) und Katzenisolaten (n=14) sowie den Isolaten sonstiger Tierarten (n=10). Eine prozentuale Betrachtung dieser Werte ist jedoch aufgrund des oben beschriebenen Bias des Probenmaterials sinnvoller. So erwiesen sich die von Rindern isolierten *E. coli*-Isolate am häufigsten als ESBL-Bildner (15,3 %). Bei den porcinen *E. coli*-Isolaten handelte es sich in nur 7,3 % der Fälle um ESBL-Bildner, bei den übrigen Tierarten machten diese einen Anteil von 3,6 bis 8,7 % aus. Bei Hunden wurden sowohl absolut (n=23) als auch prozentual (3,5 %) die meisten AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolate nachgewiesen. Bei Rindern erwiesen sich 2,0 % der



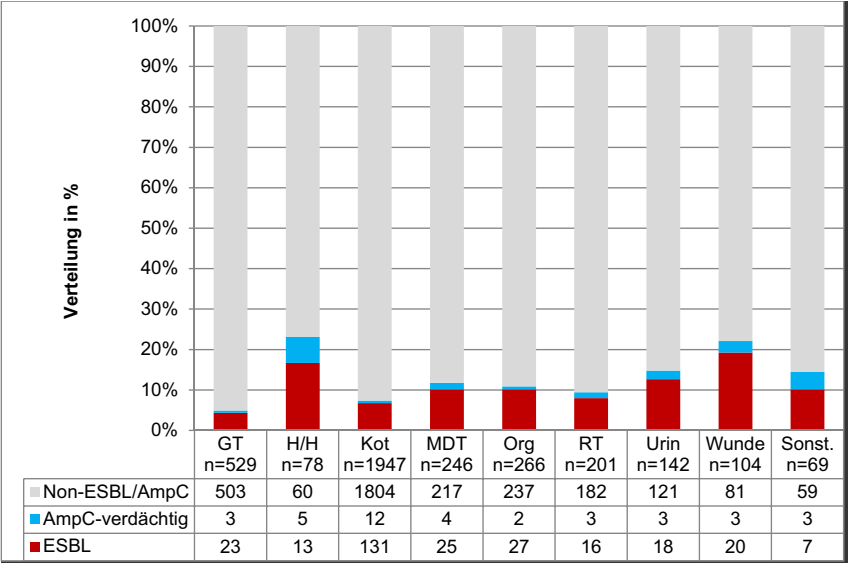
Isolate als AmpC-verdächtig, bei den anderen Tierarten machten diese Isolate 0,2-0,9 % der Gesamtisolatanzahl aus.



**Abbildung 4: ESBL-bildende (n=280) und AmpC-verdächtige (n=38) *E. coli*-Isolate, verteilt nach Tierarten**

Absolut konnten am meisten ESBL-Bildner unter den aus Kot stammenden Isolaten nachgewiesen werden (n=131), was sicherlich auch der hohen Zahl an Proben aus dieser Herkunft geschuldet ist. Prozentual gesehen erwiesen sich die Isolate aus dem Kot hingegen nach den Isolaten aus dem Genitaltrakt (4,3 %) am seltensten als ESBL-Bildner (6,7 %). Am häufigsten konnten ESBL-bildende *E. coli*-Isolate unter den Isolaten aus Wunden nachgewiesen werden (19,2 %), gefolgt von Isolaten aus Haut- und Haarproben (16,7 %) und aus dem Urin (12,7 %) (Abbildung 5).

Eine ähnliche Verteilung ließ sich bei den AmpC-verdächtigen Isolaten beobachten. Absolut konnten die meisten bei den aus dem Kot stammenden Isolaten gefunden werden (n=12), gefolgt von denen aus Haut- und Haarproben (n=5) und aus dem Magen-Darm-Trakt (MDT) (n=4). Prozentual gesehen beinhaltete die Gruppe der aus Haut- und Haarproben isolierten *E. coli*-Stämme die meisten AmpC-verdächtigen Isolate (6,4 %), danach folgten die Isolate aus den sonstigen Proben (4,3 %), aus Wunden (2,9 %) und aus Urin (2,1 %). Bei den übrigen Proben machten die AmpC-verdächtigen Isolate nur einen Anteil von 0,6-1,6 % aus (Abbildung 5).



**Abbildung 5: ESBL-bildende (n=280) und AmpC-verdächtige (n=38) *E. coli*-Isolate, verteilt nach ihrer klinischen Herkunft**

GT: Genitaltrakt, H/H: Haut/Haare, MDT: Magen-Darm-Trakt, Org: Organe, RT: Respirationstrakt, Sonst.: Sonstiges Probenmaterial

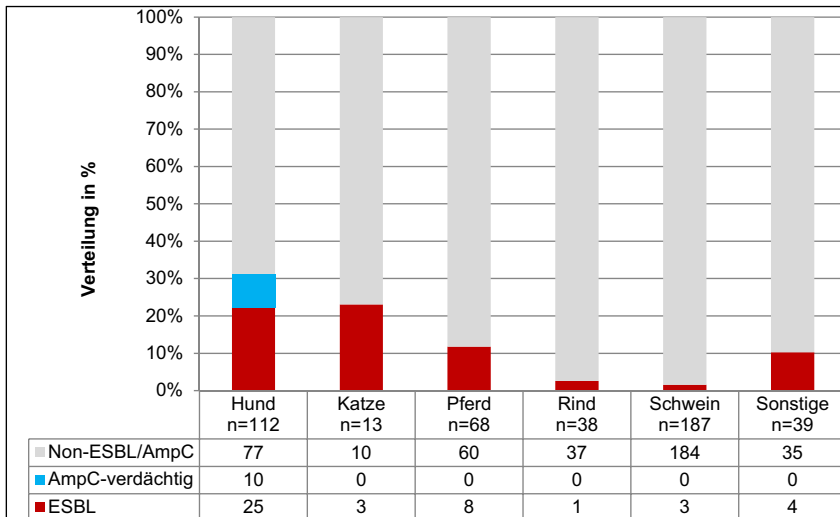
**2.1.2 Screening von *Klebsiella* spp. auf reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen**

Sowohl die 457 *K. pneumoniae* als auch die 132 *K. oxytoca*-Isolate wurden mittels der unter 2.1.1 beschriebenen Screeningmethode auf eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen getestet. Es erwiesen sich 61 der *K. pneumoniae*- und acht der *K. oxytoca*-Isolate als positiv. Nach der Durchführung des ESBL-Bestätigungstests konnten 44 *K. pneumoniae*- und 5 *K. oxytoca*-Isolate als ESBL-Bildner bestätigt werden. Hinzu kamen 10 bzw. ein AmpC-verdächtiges Isolat.

***K. pneumoniae***

Absolut konnten bei den von Hunden stammenden *K. pneumoniae*-Isolaten am meisten ESBL-Bildner nachgewiesen werden (n=25). Bei der Katze waren es drei Isolate, was einem Anteil von 23,1 % bei dieser Tierart entsprach. Bei Rindern und Schweinen war die Anzahl der ESBL-Bildner unter den *K. pneumoniae*-Isolaten insgesamt geringer (Rinder: n=1; 2,6 %, Schwein: n=3; 1,6 %).

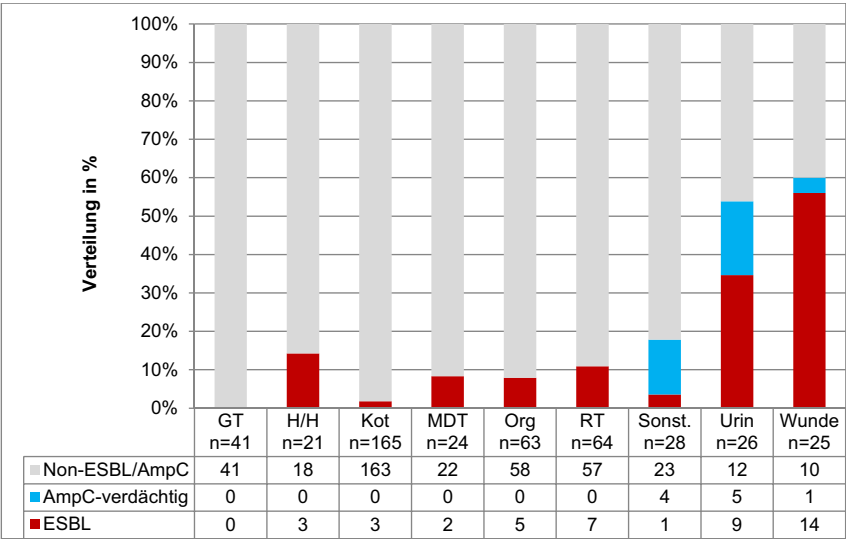
AmpC-verdächtige *K. pneumoniae*-Isolate konnten mit einem Anteil von 8,9 % nur bei den von Hunden stammenden Isolaten gefunden werden.



**Abbildung 6: Verteilung ESBL-bildender (n=44) und AmpC-verdähtiger (n=10) *K. pneumoniae*-Isolate, verteilt nach Tierarten**

Die mit Abstand meisten ESBL-Bildner unter den *K. pneumoniae*-Isolaten ließen sich sowohl prozentual als auch absolut in Wunden (n=14; 56,1 %) und im Urin (n=9; 34,6 %) nachweisen (Abbildung 7). Im Kot waren prozentual am wenigsten ESBL-Bildner (1,8 %) vorhanden. AmpC-verdächtige *K. pneumoniae*-Isolate stammten nur aus dem Urin (n=5), aus einer Wunde (n=1) und aus sonstigen Proben (n=4). Im Urin konnten prozentual am meisten AmpC-verdächtige Isolate (19,2 %) gefunden werden (Abbildung 7).

Unter den aus dem Genitaltrakt stammenden *K. pneumoniae*-Isolaten befanden sich weder ESBL-Bildner noch AmpC-verdächtige Isolate.



**Abbildung 7: Verteilung ESBL-bildender (n=44) und AmpC-verdächtiger (n=10) *K. pneumoniae*-Isolate, verteilt nach klinischer Herkunft**

GT: Genitaltrakt, H/H: Haut/Haare, MDT: Magen-Darm-Trakt, Org: Organe, RT: Respirationstrakt, Sonst.: Sonstiges Probenmaterial

**K. oxytoca**

Drei der fünf ESBL-bildenden *K. oxytoca*-Isolate stammten von Pferden, die anderen zwei von Katzen. Zwei Isolate konnten aus Kotproben und jeweils ein Isolat aus dem Respirationstrakt, aus Haut-/Haarproben und aus dem Ohr kultiviert werden. Das AmpC-verdächtige Isolat wurde im Urin eines Hundes nachgewiesen.

**2.1.3 Antibiotikaempfindlichkeit**

Mittels Agardiffusionstest wurde bei allen ESBL-bildenden und AmpC-verdächtigen *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten die Empfindlichkeit gegenüber acht antimikrobiellen Substanzen aus den Klassen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und der Fluorchinolone überprüft (Tabelle 18). Eine therapeutische Korrektur der Cephalosporine bei ESBL-bildenden *E. coli* und *K. pneumoniae* ist laut CLSI nicht mehr notwendig und wurde somit nicht durchgeführt [236]. Am häufigsten konnte bei *E. coli* erwartungsgemäß eine Resistenz gegenüber Cephalosporinen beobachtet werden, 50 % der Isolate verhielten sich zudem resistent gegenüber mindestens einem Fluorchinolon-Antibiotikum. 140 Isolate (44 %) wiesen eine kombinierte Resistenz gegenüber mindestens einem der beiden getesteten Cephalosporine und einem der getesteten Fluorchinolone auf. Alle *E. coli*-Isolate erwiesen sich als sensibel gegenüber Imipenem, 2,2 % (n=7) zeigten eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber Ertapenem.

Der Anteil der Ciprofloxacin-resistenten *K. pneumoniae*-Isolate lag bei 83,3 % und war damit deutlich höher als bei den *E. coli*-Isolaten. Auch gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure waren mit 70,4 % ebenfalls deutlich mehr Isolate resistent im Vergleich zu *E. coli* (15,4 %). Eine kombinierte Cephalosporin/Fluorchinolon-Resistenz war bei 37 *K. pneumoniae*-Isolaten (68,5 %) nachzuweisen. Unter den *K. pneumoniae*-Isolaten waren 48,1 % resistent gegenüber Ertapenem, 5,6 % gegenüber Imipenem. Die *K. oxytoca*-Isolate zeigten insgesamt weniger Resistenzen als die *K. pneumoniae*-Isolate (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Ergebnis der Empfindlichkeitsprüfung bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten mittels Agardiffusionstest**

Antimikrobielle Substanz	<i>E. coli</i> (n=318)			<i>K. pneumoniae</i> (n=54)			<i>K. oxytoca</i> (n=6)		
	Empfindlichkeit in %			Empfindlichkeit in %			Empfindlichkeit in %		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Cefotaxim <sup>2</sup>	89,0	7,5	3,5	81,5	7,4	11,1	33,3	66,7	0,0
Cefquinom <sup>3</sup>	77,0	7,6	15,4	81,5	11,1	7,4	33,3	16,7	50,0
Amoxicillin-Clavulansäure <sup>1</sup>	15,4	19,5	65,1	70,4	7,4	22,2	50,0	16,7	33,3
Imipenem <sup>1</sup>	0,0	0,0	100,0	5,6	3,7	90,7	0,0	0,0	100,0
Ertapenem <sup>2</sup>	0,0	2,2	97,8	48,1	9,3	42,6	16,7	0,0	83,3
Ciprofloxacin <sup>2</sup>	45,9	5,7	48,4	83,3	1,9	14,8	16,7	0,0	83,3
Enrofloxacin <sup>1</sup>	50,0	6,0	44,0	83,3	1,9	14,8	16,7	0,0	83,3
Pradofloxacin <sup>1</sup>	50,0	1,9	48,1	61,1	24,1	14,8	16,7	16,7	66,6

1= nach [235], 2= nach [236], 3= nach Rosco Diagnostica, Taastrup (DK): "Interpretation of the Antibigramme with Neo-Sensitabs"

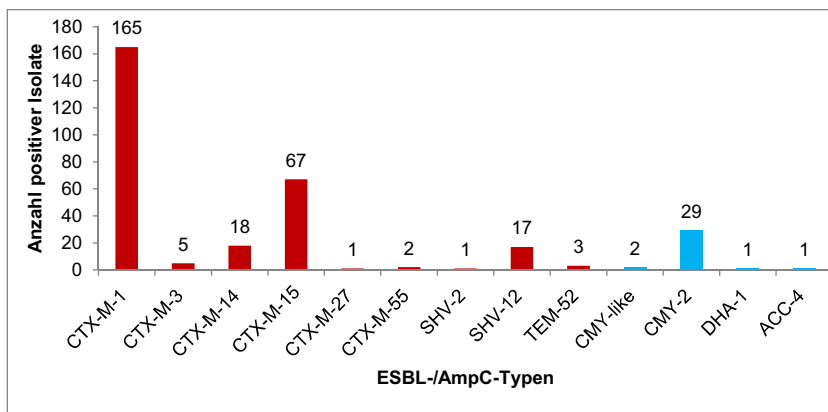
## 2.2 Genotypische Charakterisierung

### 2.2.1 Nachweis von ESBL-/erworbenen AmpC-Genen

#### 2.2.1.1 *E. coli*

Bei 272 der 280 phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten Isolate konnte ein ESBL-Gen nachgewiesen werden, drei Isolate trugen ein erworbenes AmpC-Gen. Fünf Isolate konnten mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Methoden genotypisch nicht als ESBL- oder AmpC-Bildner bestätigt werden. Bei 25 der 38 AmpC-verdächtigen Isolate konnte ein erworbenes AmpC-Gen nachgewiesen werden, die übrigen 13 Isolate wiesen weder ein ESBL- noch ein erworbenes AmpC-Gen auf. Diese und die fünf Isolate, die phänotypisch, jedoch nicht genotypisch als ESBL-Bildner bestätigt werden konnten, werden in Tabelle 19 und Tabelle 20 als „nicht typisierbar“ bezeichnet.

Am häufigsten konnte das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (n=165) nachgewiesen werden, gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=67) und *bla*<sub>CMY-2</sub> (n=29). Auch die SHV-ESBL konnten in Form von SHV-12 (n=17) und SHV-2 (n=1) gefunden werden. Neben drei Isolaten, die die ESBL TEM-52 aufwiesen, konnten bei weiteren Isolaten andere Gene aus der CTX-M-Familie und unterschiedliche erworbene AmpC nachgewiesen werden. In einigen Fällen konnte der genaue Typ einer ESBL-/AmpC durch die Sequenzanalyse nicht ermittelt werden. Für diese Isolate wurde im Folgenden die Bezeichnung „-like“ verwendet. Sechs *E. coli*-Isolate kombinierten in ihrem Genotyp ein ESBL- mit einem AmpC-Gen (CMY-2/CTX-M-15, CMY-like/CTX-M-15, CMY-like/CTX-M-1, ACC-4/CTX-M-1, CMY-2/SHV-12); acht Isolate zeigten eine Kombination aus zwei ESBL-Genen (CTX-M-15/SHV-12, CTX-M-1/SHV-12).



**Abbildung 8: Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen bei *E. coli***

Etwas mehr als die Hälfte der CTX-M-1-Enzyme (52,7 %) konnte beim Schwein nachgewiesen werden. Bei dieser Tierart machte dieser Typ auch den Großteil der nachgewiesenen ESBL-Gene aus (78,4 %), ebenso bei Rindern (53,8 %) und bei Pferden (58,1 %). Bei Hunden überwog dahingegen der CTX-M-15-Typ (50 %), welcher bei den Großtieren im Vergleich zu CTX-M-1 deutlich weniger vorkam (s. Tabelle 19). Hervorzuheben ist des Weiteren, dass 72,4 % der CMY-2-Enzyme beim Hund nachgewiesen werden konnten. Auch die ESBL vom SHV-12-Typ konnte mit Ausnahme vom Pferd hauptsächlich bei Hund und Katze gefunden werden, bei Rind und Schwein nur jeweils in einem Fall. Die Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen in Bezug auf Tierarten ist in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19: ESBL-/AmpC-Typen bei *E. coli*, verteilt nach Tierarten**

ESBL-/ AmpC-Typ	Hund (n=73)	Katze (n=16)	Pferd (n=44)	Rind (n=59)	Schwein (n=114)	Sonstige (n=12)
<b>n positive Isolate</b>						
CTX-M-1	19	5	24	28	87	2
CTX-M-3	0	0	1	2	2	0
CTX-M-14	1	0	1	8	6	2
CTX-M-15	25	5	12	11	10	4
CTX-M-27	0	0	0	0	1	0
CTX-M-55	1	1	0	0	10	0
SHV-12	9	2	5	0	1	0
SHV-2	0	0	0	0	1	0
TEM-52	0	1	0	0	2	0
CMY-like	1	0	0	0	1	0
CMY-2	21	2	2	2	1	1
DHA-1	0	0	0	0	0	1
ACC-4	0	0	0	1	0	0
nicht typisierbar	7	0	7	1	1	2

Bezüglich der klinischen Herkunft konnten 60 % der CTX-M-1-Enzyme bei Isolaten aus Kotproben gefunden werden. Hier machten sie 70,2 % der insgesamt nachgewiesenen ESBL-Gene aus. Die restlichen 40 % der CTX-M-1-Enzyme verteilten sich auf das übrige klinische Probenmaterial. Vor allem aber wies ein Großteil der Isolate aus dem Respirationstrakt (68,8 %), aus dem Genitaltrakt (43,5 %), aus dem MDT (52,0 %) und aus Wunden (55,0 %) das *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Gen auf. Mehr als die Hälfte der ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate aus dem Urin besaß eine ESBL vom Typ CTX-M-15 (55,6 %), ebenso die Isolate aus den Organen (44,4 %). Die Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen in Bezug auf die klinische Herkunft ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: ESBL-/AmpC-Typen bei *E. coli*, verteilt nach klinischer Herkunft

ESBL- / AmpC-Typ	GT (n=26)	H/H (n=18)	Kot (n=143)	MDT (n=29)	Anzahl positive Isolate							
					Organe (n=29)	RT (n=19)	Urin (n=21)	Wunden (n=23)	Sonstige (n=10)			
CTX-M-1	11	4	99	13	5	11	6	12	4			
CTX-M-3	1	0	2	1	1	0	0	0	0			
CTX-M-14	0	0	9	3	6	0	0	0	0			
CTX-M-15	7	7	13	6	12	4	10	5	3			
CTX-M-27	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
CTX-M-55	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
SHV-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
SHV-12	3	1	2	0	0	1	6	4	0			
TEM-52	0	0	2	0	0	0	0	1	0			
CMY-like	0	1	0	0	0	0	0	1	0			
CMY-2	3	3	6	3	3	1	4	3	3			
DHA-1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
ACC-4	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
nt	1	3	7	2	1	2	0	1	0			

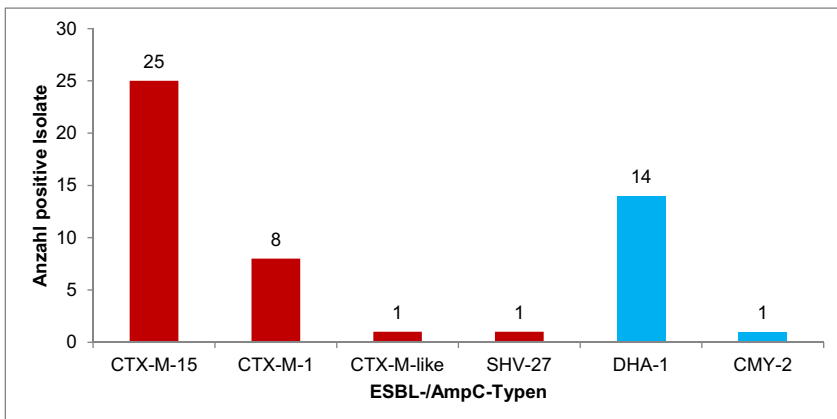
GT: Genitaltrakt, H/H: Haut/Haare, MDT: Magen-Darm-Trakt, RT: Respirationstrakt, nt: nicht typisierbar



### 2.2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Von den 44 phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten *K. pneumoniae*-Isolaten konnten 35 auch genotypisch als solche bestätigt werden. Sechs erwiesen sich als AmpC-Bildner, drei Isolate konnten mit den Methoden dieser Arbeit genotypisch weder als ESBL- noch als AmpC-Bildner bestätigt werden. Neun der 10 AmpC-verdächtigen Isolate ließen sich auch genotypisch als solche bestätigen, lediglich ein Isolat entzog sich der genaueren Genotypisierung.

Unter den 35 ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten trugen 25 Isolate das *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-Gen, acht Isolate *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und jeweils ein Isolat *bla*<sub>CTX-M-like</sub> und *bla*<sub>SHV-27</sub>. Von den AmpC-Genen trat am häufigsten *bla*<sub>DHA-1</sub> auf, nur ein Isolat besaß ein *bla*<sub>CMY-2</sub>-Gen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: ESBL-/AmpC-Typen bei *K. pneumoniae***

Unter den 25 ESBL-*K. pneumoniae*-Isolaten vom CTX-M-15-Typ stammten 17 von Hunden. Bei dieser Tierart machte CTX-M-15 nahezu die Hälfte der gesamten ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate aus. Drei ESBL-bildende *K. pneumoniae*-Isolate stammten von der Katze, auch sie besaßen alle die ESBL vom Typ CTX-M-15. Die *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Gene konnten hingegen überwiegend bei den Großtieren gefunden werden (n=6). Des Weiteren konnte die AmpC DHA-1 überwiegend beim Hund nachgewiesen werden (n=13). Die genaue Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen in Bezug auf die Tierarten ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: ESBL-/AmpC-Typen bei *K. pneumoniae*, verteilt nach Tierarten

ESBL-/AmpC-Typ	Hund (n=35)	Katze (n=3)	Pferd (n=8)	Rind (n=1)	Schwein (n=3)	Sonstige (n=4)
	Anzahl positive Isolate					
CTX-M-15	17	3	4	0	0	1
CTX-M-1	1	0	2	1	3	1
CTX-M-like	0	0	1	0	0	0
SHV-27	1	0	0	0	0	0
DHA-1	13	0	0	0	0	1
CMY-2	1	0	0	0	0	0
nicht typisierbar	2	0	1	0	0	1

Die CTX-M-15- Enzyme fanden sich überwiegend in Proben aus Wunden (n=10), aus dem Respirationstrakt (n=5) und aus dem Urin (n=6). Auch der Nachweis der AmpC DHA-1 gelang vermehrt bei Isolaten aus dem Urin (n=8). Die Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen in Bezug auf die klinische Herkunft ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: ESBL-/AmpC-Typen bei *K. pneumoniae*, verteilt nach klinischer Herkunft

ESBL-/AmpC-Typ	H/H (n=3)	Kot (n=3)	MDT (n=2)	Organe (n=5)	RT (n=7)	Urin (n=14)	Wunde (n=15)	Sonstiges (n=5)
	Anzahl positive Isolate							
CTX-M-15	1	1	1	0	5	6	10	1
CTX-M-1	1	1	1	3	1	0	1	0
CTX-M	0	0	0	0	0	0	1	0
SHV-27	1	0	0	0	0	0	0	0
DHA-1	0	1	0	0	0	8	2	3
CMY-2	0	0	0	0	0	0	1	0
nicht typisierbar	0	0	0	2	1	0	0	1

H/H: Haut/Haare, MDT: Magen-Darm-Trakt, RT: Respirationstrakt

2.2.1.3 *K. oxytoca*

Alle phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten *K. oxytoca*-Isolate konnten auch genotypisch als solche bestätigt werden. Drei Isolate besaßen eine ESBL vom Typ SHV-12 und jeweils ein Isolat die ESBL-Typen CTX-M-1 und CTX-M-3. Das AmpC-verdächtige *K. oxytoca*-Isolat konnte genotypisch weder als ESBL- noch als AmpC-Bildner bestätigt werden.

2.2.2 Nachweis von Mutationen bei *E. coli* in der AmpC-Promotor-Region

Durch Amplifikation und anschließender Sequenzierung des *ampC*-Gen-Promotors konnte bei 12 der 13 *E. coli*-Isolate, die phänotypisch als AmpC-verdächtig galten, bei denen jedoch kein erworbenes AmpC-Gen mittels PCR nachgewiesen werden konnte, eine oder mehrere Mutationen in der Region des *ampC*-Gen-Promotors gefunden werden. Dies deutet auf eine Verstärkung des Promotors und eine damit einhergehende Hyperproduktion der konstitutiv

gebildeten AmpC hin. Die Isolate 1 bis 9 (Tabelle 23) wiesen bei -18 einen Basenaustausch von G > A, bei -1 und +42 jeweils einen Basenaustausch von C > T und bei +58 einen Basenaustausch von C > T auf. Isolat-Nr. 10 besaß keine Mutationen bei -18 und -1, dafür fehlte eine Base (A) bei +5. Isolat-Nr. 11 besaß neben den o.g. Basenaustauschen zusätzlich bei +37 einen Basenaustausch von G > A. Darüber hinaus wies es bei der -35-Box die Konsensus-Sequenz TTGACA auf. Bei Isolat-Nr. 12 fehlte die Mutation an Position -42 (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Überblick über *E. coli*-Isolate mit Mutationen im *ampC*-Promotor, deren Position und die dadurch vermittelten Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika im Agardiffusionstest (s. 2.1.5.1)**

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	Position der Mutation im <i>ampC</i> -Promotor (in Bezug auf <i>E. coli</i> K-12, s. 2.3.2.4)	Resistenz/eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber
1	23214	-18, -1, -42, +58	CTX, CEF, AMC
2	23219	-18, -1, -42, +58	AMC (I)
3	23227	-18, -1, -42, +58	AMC
4	23228	-18, -1, -42, +58	AMC
5	23241	-18, -1, -42, +58	CTX (I), AMC
6	23242	-18, -1, -42, +58	CTX (I), AMC
7	23244	-18, -1, -42, +58	AMC
8	23247	-18, -1, -42, +58	AMC
9	23251	-18, -1, -42, +58	CTX (I), AMC
10	23236	-42, +58, +5	CTX (I), CEF (I)
11	23239	-18, -1, -42, +58, -35, +37	CTX (I), CEF (I), AMC
12	23245	-18, -1, +58	CTX (I), AMC

I=eingeschränkte Empfindlichkeit

## 2.2.3 Nachweis weiterer $\beta$ -Laktamase-Gene

### 2.2.3.1 *E. coli*

Von den 318 im phänotypischen Bestätigungstest getesteten *E. coli*-Isolaten konnten 172 positiv für *bla*<sub>TEM-like</sub> getestet werden. Die TEM-Gene wurden nur sequenziert, wenn bei dem entsprechenden Isolat keine andere ESBL/AmpC bestimmt werden konnte. In den anderen Fällen wurde aufgrund des sehr häufigen Vorkommens von TEM-1 von einer Sequenzierung abgesehen und der genaue TEM-Typ nicht bestimmt. Darüber hinaus besaßen 27 Isolate eine  $\beta$ -Laktamase aus der OXA-Gruppe-1, neun Isolate eine aus der OXA-Gruppe 2. Bei zwei Isolaten konnte ein *bla*<sub>SHV-like</sub>-Gen nachgewiesen werden, von dem der genaue Typ mittels Sequenzanalyse nicht ermittelt werden konnte.

### 2.2.3.2 *Klebsiella* spp.

Von 54 im phänotypischen Bestätigungstest überprüften *K. pneumoniae*-Isolaten besaßen 47 ein SHV-Gen. Darunter befanden sich die Genvarianten *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub> und *bla*<sub>SHV-28</sub>. Bei 36 Isolaten konnte eine  $\beta$ -Laktamase aus der OXA-Gruppe-1, bei drei Isolaten eine aus der OXA-Gruppe 2 nachgewiesen werden. 32 *K. pneumoniae*-Isolate waren zudem positiv für *bla*<sub>TEM-like</sub>. Auch bei vier *K. oxytoca*-Isolaten konnte *bla*<sub>TEM-like</sub> nachgewiesen werden.

## 2.2.4 Nachweis plasmidkodierter Chinolon-Resistenz- („PMQR“-)-Gene

### 2.2.4.1 *E. coli*

Von 318 phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten bzw. AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolaten besaßen 69 ein oder mehrere plasmidkodierte Chinolonresistenzgene. Bei der Hälfte der Isolate (50,7 %) konnte dabei das Gen für die Aminoglykosid-Acetyltransferase *Aac*(6')-Ib-cr nachgewiesen werden (Abbildung 10). Am zweithäufigsten kam das Qnr-Protein-Gen *qnrS1* (40,6 %) vor, gefolgt von *qnrB2* (10,1 %) und *qnrB19* (5,8 %). Die Effluxpumpe *Oqx*B trat nur in einem Fall auf. Sieben Isolate besaßen sowohl das *qnrS1*- als auch das *aac*(6')-Ib-cr-Gen (Abbildung 10).

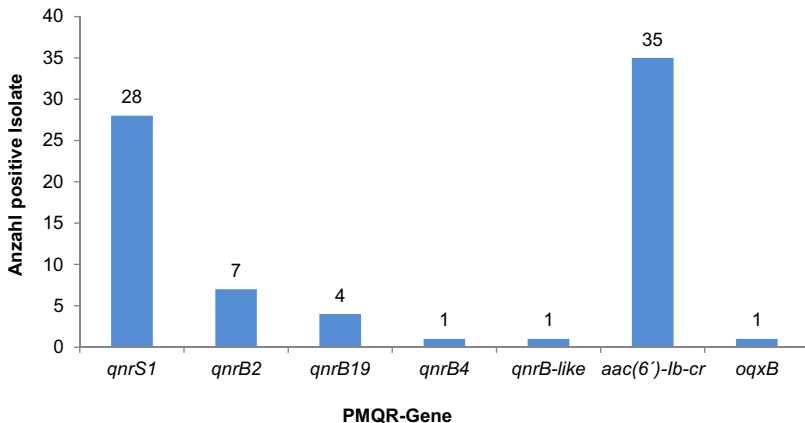
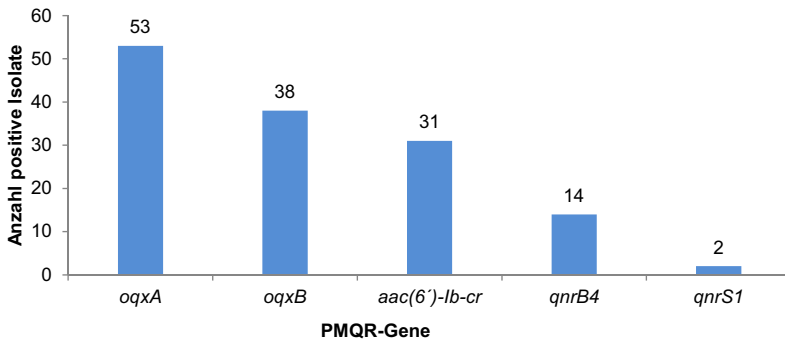


Abbildung 10: PMQR-Gene bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolaten

### 2.2.4.2 *Klebsiella* spp.

Von 54 phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten bzw. als AmpC-verdächtig geltenden *K. pneumoniae*-Isolaten besaßen 53 eine oder mehrere PMQR-Gene. Das Gen für die Effluxpumpe *Oqx*A besaßen 53 der Isolate (98,1 %), 38 Isolate (70,3 %) das Gen für die

Effluxpumpe OqxB. Auch das Gen für das Qnr-Protein QnrB4 war bei 14 (25,9 %) der *K. pneumoniae*-Isolate vorhanden. Die Tendenz gleichzeitig mehrere PMQR-Mechanismen zu besitzen, war bei *K. pneumoniae* deutlich höher als bei *E. coli*. Sechs (11,3 %) Isolate wiesen einen, 16 (30,2 %) zwei, 24 (45,3 %) drei und 7 Isolate (13,2 %) sogar vier unterschiedliche PMQR-Mechanismen auf. Oftmals konnten dabei *oqxA* und *aac(6')-Ib-cr* gemeinsam in einem Isolat nachgewiesen werden (n=31) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: PMQR-Gene bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *K. pneumoniae*-Isolaten**

## 2.2.5 Kombinationen aus ESBL-/AmpC und PMQR

### 2.2.5.1 *E. coli*

Achtundzwanzig *E. coli*-Isolate kombinierten in ihrem Genom das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> mit *aac(6')-Ib-cr*. Das entsprach 41,8 % der CTX-M-15 tragenden *E. coli*-Isolate. Des Weiteren konnte eine Häufung für die Kombination *bla*<sub>SHV-12</sub>-*qnrS1* beobachtet werden. 64,7 % (n=11) der SHV-12 tragenden *E. coli*-Isolate besaßen zusätzlich das *qnrS1*-Gen. Sieben dieser Isolate besaßen zusätzlich ein *aac(6')-Ib-cr*-Gen. Von den 165 CTX-M-1 tragenden *E. coli*-Isolaten konnte bei 23 Isolaten (13,9 %) eine PMQR-Determinante nachgewiesen werden, am häufigsten QnrS1 (n=11). Von den 29 *E. coli*-Isolaten, die die AmpC CMY-2 besaßen, wiesen 10 (34,7 %) eine PMQR-Determinante auf, sechs davon das Qnr-Protein QnrB2. CTX-M-14, die dritthäufigste ESBL unter den *E. coli*-Isolaten, trat in allen Fällen ohne eine zusätzliche PMQR-Determinante auf (Tabelle 24).

Tabelle 24: Kombination von ESBL-/AmpC-Typen mit PMQR bei *E. coli*

ESBL-/ AmpC-Typ	PMQR-Determinante						
	QnrS1 (n=28)	QnrB2 (n=7)	QnrB19 (n=4)	QnrB4 (n=1)	QnrB-like (n=1)	Aac(6')-Ib- cr (n=35)	OqxB (n=1)
	Anzahl positive Isolate						
CTX-M-15 (n=67)	8	0	0	0	0	28	0
CTX-M-1 (n=165)	11	1	4	1	0	7	1
CTX-M-14 (n=18)	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-27 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-3 (n=5)	2	0	0	0	0	0	0
CTX-M-55 (n=2)	0	0	0	0	0	0	0
SHV-12 (n=17)	11	1	0	0	0	6	0
SHV-2 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0
TEM-52 (n=3)	0	0	0	0	0	0	0
CMY-like (n=2)	0	0	0	0	0	1	0
CMY-2 (n=29)	2	6	0	0	0	2	0
DHA-1 (n=1)	0	0	0	0	1	0	0

2.2.5.2 *Klebsiella* spp.

Bei allen CTX-M-15-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten ließ sich das PMQR-Gen *oqxA* nachweisen, bei 23 zusätzlich *aac(6')-Ib-cr*. Das Gen für die Effluxpumpe *OqxA* war bei allen CTX-M-1 bildenden Isolaten vorhanden, ebenso wie bei 12 von 15 DHA-1- positiven Isola- ten. Diese besaßen zudem alle das Gen *qnrB4* und größtenteils zusätzlich *oqxB*, das auch bei fünf CTX-M-1-positiven *K. pneumoniae*-Isolaten nachgewiesen werden konnte (Tabelle 25).

Tabelle 25: Kombination von ESBL-/AmpC-Typen mit PMQR bei *K. pneumoniae*

ESBL-/ AmpC-Typ	PMQR-Determinanten				
	OqxA (n=50)	OqxB (n=17)	Aac(6')-Ib- cr (n=31)	QnrB4 (n=14)	QnrS1 (n=2)
	Anzahl positive Isolate				
CTX-M-15 (n=25)	25	1	23	0	0
CTX-M-1 (n=8)	8	5	1	0	1
DHA-1 (n=15)	12	12	8	15	0
SHV-27 (n=1)	1	0	0	0	1
CMY-2 (n=1)	0	0	0	0	0

2.2.6 Virulenzassoziierte Gene bei *E. coli*-Isolaten aus dem Magen-Darm-Trakt von Schweinen und Rindern

Mittels der nach Barth *et al.* modifizierten Bosworth-PCR [240] konnten die 97 ESBL- bildenden bzw. AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolate, die aus dem Kot bzw. MDT von Schwe- inen stammten, auf neun für beim Schwein mit Diarrhoe-assoziierte VAGs untersucht wer- den. Ein Großteil dieser Isolate (87,2 %) wies keines der untersuchten VAGs auf. Bei drei

Isolaten konnte die Kombination der Gene für das hitzelabile Enterotoxin, das hitzestabile Enterotoxin I und für die F4-Fimbrie nachgewiesen werden. Vier Isolate besaßen zusätzlich das Gen für das hitzestabile Enterotoxin II. Zwei Isolate waren positiv für *eae*, *bfp* konnte jedoch in beiden Fällen nicht nachgewiesen werden. Ein Isolat besaß das Shigatoxin 2e-Gen (Tabelle 26).

Die 46 aus dem Kot bzw. aus dem MDT von Rindern stammenden ESBL-bildenden bzw. AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolate wurden mittels der PCR zum Nachweis virulenzassoziierten Gene bei *E. coli*-Isolaten von Rindern modifiziert nach van Bost, Franck und Nguyen untersucht. Bei 14 Isolaten (30,4 %) konnte keines der gesuchten VAGs gefunden werden. Die bei den übrigen Isolaten nachgewiesenen Gene *papC*, *iucD* und *f17* kommen auch bei nicht von Rindern stammenden *E. coli* vor und ermöglichen keine Zurodnung zu einem bestimmten Pathotyp.

**Tabelle 26: Virulenzassoziierte Gene bei ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* aus dem Magen-Darm-Trakt von Schweinen und Rindern**

<b><i>E. coli</i>-Isolate MDT Schwein (n=97)</b>		<b><i>E. coli</i>-Isolate MDT Rind (n=46)</b>	
Virulenzassoziiertes Gen	n/%	Virulenzassoziiertes Gen	n/%
<i>estb+elt+f4</i>	3/3,1	<i>iucD</i>	8/17,4
<i>estb+estap+elt+f4</i>	4/4,1	<i>papC</i>	8/17,4
<i>estb+estap+elt</i>	1/1,0	<i>iucD+papC</i>	11/23,9
<i>estb+estap+f18</i>	1/1,0	<i>f17</i>	3/6,5
<i>eae</i>	2/2,1	<i>f17+iucD</i>	1/2,2
<i>stx2e</i>	1/1,0	<i>f17+iucD+papC</i>	1/2,2
negativ	85/87,2	negativ	14/30,4

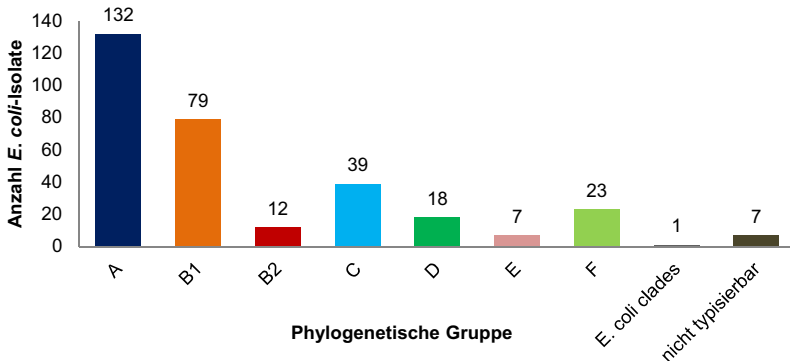
*estb*: hitzestabiles Enterotoxin I, *estap*: hitzestabiles Enterotoxin II, *elt*: hitzelabiles Enterotoxin, *f4*: F4-Fimbrie, *f18*: F18-Fimbrie, *eae*: Intimin, *stx2e*: Shigatoxin 2e, *iucD*: Eisenaufnahmesystem, *papC*: P-Fimbrie, *f17*: F17-Fimbrie

## 2.3 Phylogenetische Untersuchungen

### 2.3.1 *E. coli*

Alle 318 *E. coli*-Isolate, die phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigt werden konnten oder als AmpC-verdächtig galten, wurden mittels der Quadruplex-PCR nach Clermont [138] in phylogenetische Gruppen eingeteilt. Die Zuordnung der Isolate in die einzelnen Gruppen ist in Abbildung 12 dargestellt. Der größte Teil konnte dabei den i. d. R. kommensale *E. coli* beherbergenden Gruppen A (n=132) und B1 (n=79) zugeordnet werden. Zwölf Isolate erwiesen sich als der Gruppe B2 zugehörig, der meist extraintestinal pathogene *E. coli* angehören. Achtzehn bzw. 23 Isolate fielen in die ebenfalls oftmals ExPEC beinhaltenden Gruppen D

und F. Sieben Isolate wurden in die Gruppe E eingeordnet, 39 in die Gruppe C. Sieben Isolate konnten mithilfe der PCR nicht typisiert werden (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Verteilung der phylogenetischen Gruppen bei phänotypisch bestätigten ESBL-bildenden und AmpC-verdächtigen *E. coli***

### 2.3.1.1 ESBL-/AmpC-bildende *E. coli*-Isolate aus den phylogenetischen Gruppen B2, D und F

Da ExPEC-Isolate besonders häufig den Phylogruppen B2, D und F angehören, wurden die Isolate dieser Gruppen näher typisiert, um Rückschlüsse auf das pathogenetische Potential ziehen und Vergleiche mit humanen ExPEC-Isolaten diskutieren zu können.

#### Multilokus-Sequenztypen

Von den 30 Isolaten, die den Phylogruppen B2 und D angehörten (Abbildung 12), wurde der Sequenztyp ermittelt. Unter den Gruppe B2-Isolaten konnten sieben verschiedene ST nachgewiesen werden. Drei Isolate wurden dem ST131 zugeordnet, jeweils zwei Isolate gehörten zu den ST ST141, ST372 und ST73.

Unter den Gruppe D-Isolaten konnten acht verschiedene ST nachgewiesen werden. Dem ST973 gehörten dabei vier, den ST ST38, ST405, ST68 und ST69 jeweils zwei Isolate an. Isolat IHIT23192 gehörte einem bis dato unbekannten ST, dem ST1034, an (Tabelle 27).

Unter den Phylogruppe F *E. coli*-Isolaten erwiesen sich 14 als dem ST648 zugehörig. Die übrigen neun Isolate verteilen sich auf die ST ST117 (n=3), ST354 (n=2), ST42, ST1340, ST1674 und ST967 (jeweils n=1) (Tabelle 28).



### **Virulenzassoziierte Gene**

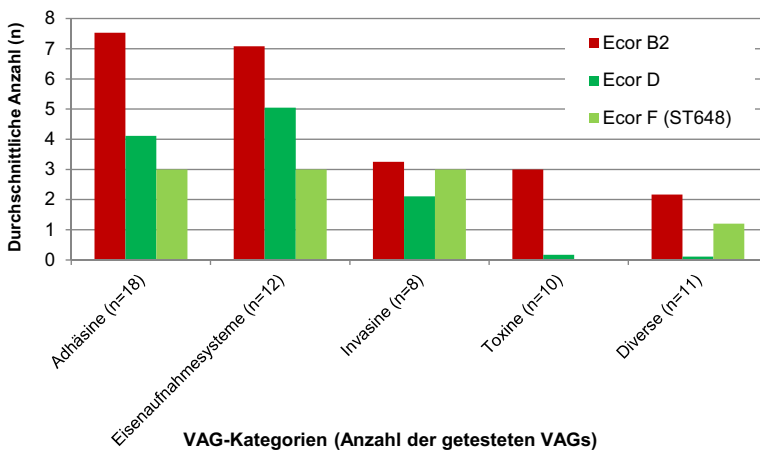
Mit den MP-PCRs I-IX wurden die *E. coli*-Isolate aus den Phylogruppen B2 (n=12) und D (n=18) auf das Vorhandensein von VAGs untersucht. Die B2-*E. coli*-Isolate besaßen im Mittel 23 (+7, -6) der 59 getesteten VAGs. Bei den Gruppe-D-*E. coli* waren es 12 VAGs ( $\pm$  5).

Hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) am häufigsten konnten bei den *E. coli*-Isolaten aus der Ecor-Gruppe B2 die Gene für Adhäsine und Eisenaufnahmesysteme nachgewiesen werden. Im Durchschnitt besaßen die Isolate sieben Adhäsine-Gene. Bei allen 12 Isolaten konnten das für Curli kodierende Gen *csgA* und die für unterschiedliche Fimbrientypen kodierenden Gene *fimC* und *mat* detektiert werden. Das Hitze-resistente Agglutinin-Gen *hra* kam bei 11 Isolaten vor. Weitere häufiger nachgewiesene Adhäsine waren S- und F1C-Fimbrien (*sfa/foc*) und unterschiedliche Gene der P-Fimbrien (*papAH*, *papEF*, *papGII*, *III*). Zudem besaßen sie im Durchschnitt sieben Gene, die den Eisenaufnahmesystemen zugeordnet werden. Alle Isolate wiesen die für das Yersiniabaktin-System wichtigen Gene *fyuA* und *irp2* auf, 10 Isolate besaßen darüber hinaus *sitA* und *feoB* und auch das für den Salmochelin-Rezeptor kodierende Gen *iroN* konnte bei acht Isolaten nachgewiesen werden. Sowohl von den den Invasinen/Protektinen zugeordneten Genen als auch von den überprüften Toxingenen besaßen die Gruppe B2- *E. coli*-Isolate im Durchschnitt drei Gene. Häufig nachgewiesene Toxingene waren dabei *cnf1/2* und *hlyA* (Abbildung 13, Tabelle 27).

Auch die *E. coli*- Isolate aus der phylogenetischen Gruppe D besaßen hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) am meisten VAGs aus den Gruppen der Eisenaufnahmesysteme und der Adhäsine. Neben *feoB*, das bei allen 18 Isolaten nachgewiesen werden konnte, traten häufig die in die Aerobaktin-Synthese involvierten Gene *iucD* und *iutA* sowie das Yersiniabaktin-Synthese-Gen *irp2* auf. Von den mit Adhäsion assoziierten Genen konnten bei den Ecor D-*E. coli*-Isolaten im Durchschnitt vier nachgewiesen werden. Bei allen Isolaten konnten, wie auch schon bei den Ecor B2-*E. coli*-Isolaten, Gene für Curli-Fimbrien (*csgA*), Typ 1-Fimbrien (*fimC*) und MAT-Fimbrien (*mat*) nachgewiesen werden. Zudem kamen aber auch das Blutgruppen M-spezifische Adhäsine (*bmaE*) und andere Adhäsingene (*iha*, *hra*) mehrmals vor. Bei einer Mehrzahl der Isolate konnte außerdem das Outer membrane protein A-Gen (*ompA*) nachgewiesen werden. Andere Invasin/Protektin- und auch Toxin-Gene waren nur vereinzelt vertreten (Tabelle 27, Abbildung 13).

Die dem ST648 angehörenden Isolate aus der phylogenetischen Gruppe F wurden aufgrund seiner besonderen Bedeutung durch eine häufig vorkommende Kombination von Multiresistenz und Virulenz ebenfalls auf das Vorhandensein von VAGs untersucht. Bei keinem der Isolate konnte ein Toxinogen gefunden werden. Bei allen Isolaten ließen sich hingegen die Adhäsine-Gene *fimC*, *mat* und *csgA* und zusätzlich die für Teile verschiedener Eisenaufnahmesysteme wichtigen Gene *feoB* und *chuA* nachweisen. Jedes Isolat besaß außerdem das

für einen Zuckertransporter kodierende und als Marker für eine PAI fungierende Gen *malX*. Die Gruppe F-ST648- *E. coli*-Isolate sind in Tabelle 28 gelistet.



**Abbildung 13: Durchschnittlicher Nachweis von VAGs aus unterschiedlichen Kategorien bei Ecor B2-, D- und F-*E. coli*-Isolaten**

Tabelle 27: Übersicht über die Herkunft der Ecor B2- und Ecor D-E. *col*/Isolate, deren Sequenztypen und virulenzassoziierte Gene

IHIT-Nr.	Probenmaterial	Tierart	Ecor-Typ	ST	Virulenzassoziierte Gene nach Kategorien			
					Adhäsine	Eisenaufnahmesysteme	Invasive/Protektine	Toxine
22905	CT	Pferd	B2	ST80	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13	1, 2, 3, 7	1, 2, 3, 4
22973	Urin	Katze	B2	ST131	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	2, 3, 5, 7, 8, 13	1, 8	1, 3, 4, 5
22974	KT	Schwein	B2	ST131	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	2, 3, 5, 7, 8, 13	1, 8	1, 3, 4, 5
22985	Pfote	Hund	B2	ST141	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14	1, 2, 3, 13	1, 7	1, 2, 3, 4
23070	Kot	Schwein	B2	ST998	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14	1, 2, 3, 13	1, 2	1, 2, 3, 4
23085	Kot	Schwein	B2	ST174	1, 3, 4, 5	1, 2, 3, 5, 6, 9, 13	3, 4, 5, 8	-
23118	HT	Katze	B2	ST73	3, 4, 5, 11, 14	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11	3	1, 2, 3, 4
23191	Kot	Schwein	B2	ST131	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13	1, 2, 3, 4, 5, 8	6, 8
23222	Organe	Schweinswal	B2	ST73	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13	1, 3, 5, 8	2, 3
23232	Kot	Hund	B2	ST372	1, 3, 4, 5, 11, 14	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13	2, 3	-
23235	VT	Hund	B2	ST372	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13	2, 3, 5, 8	1, 2, 3, 4
23236	Analdrüse	Hund	B2	ST141	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14	1, 2, 3, 5, 6, 10, 13	1, 2, 3, 5, 7, 8	1, 2, 3, 4
22903	Analdrüse	Hund	D	ST973	3, 4, 5	1, 10	3, 8	-
22904	RT	Hund	D	ST973	2, 3, 4, 5, 6, 14	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	3, 6	-
22924	UT	Pferd	D	ST69	3, 4, 5, 7, 12, 14	1, 4, 5, 8, 9, 10	2, 3, 8	7
22964	Kot	Rind	D	ST925	3, 4, 5, 12	1, 5, 7, 8	8	-
22968	Isolat	Schwein	D	ST69	3, 4, 5	1, 2, 3, 5, 7, 8	-	-
23024	Kot	Rind	D	ST106	3, 4, 5, 7, 12	1, 5, 7, 8	8	7
22980	Darm	Schwein	D	ST38	3, 4, 5	1, 2, 3	-	-
23086	Kralle	Hund	D	ST405	3, 4, 5	1, 2, 3, 5, 10	3, 4, 8	-
23119	Kot	Hund	D	ST973	3, 4, 5, 7, 12	1, 5, 7, 8, 9, 10, 11	3	-

Fortsetzung der Tabelle 27

IHIT-Nr.	Proben- material	Tierart	Ecor- Typ	ST	Adhäsine	Virulenzassoziierte Gene nach Kategorien		
						Eisenaufnahme- systeme	Invasive/ Protektine	Toxine
23126	Kot	Rind	D	ST106	3, 4, 5, 7, 12	1, 7, 8, 9, 10, 11	3, 8	-
23131	Kot	Rind	D	ST362	3, 4, 5, 7, 12	1, 2, 3, 10	3, 8	-
23138	Kot	Rind	D	ST106	3, 4, 5, 7, 12	1, 5, 8, 9, 10	3, 8	-
23149	Kot	Hund	D	ST973	3, 4, 5, 7, 12, 14	1, 5, 7, 8, 9, 10, 11	3, 8	-
23192	Kot	Schwein	D	ST1034	3, 4, 5	1, 10, 12, 13	3, 8, 9	-
23211	Z-Urin	Katze	D	ST405	3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10	1, 3, 4, 5, 8	6
23221	Kot	Huhn	D	ST68	3, 4, 5	1, 5, 7, 8, 10	3, 5, 8	-
23231	VT	Hund	D	ST38	3, 4, 5	1, 5, 10	1, 3	-
23243	Kot	Hund	D	ST68	3, 4, 5	1, 2, 3, 5, 10	1, 3	-

72

CT = Cervixutpfer; KT = Kottupfer; HT = Hautupfer; RT = Rachentupfer; UT = Uterustupfer; VT = Vaginaltupfer; Z-Urin = Zystozentesurin  
**Adhäsine:** 1: *sfa/foc*; 2: *papC*; 3: *fimC*; 4: *csgA*; 5: *mat*; 6: *papAH*; 7: *iha*; 8: *papGI/II*; 9: *papEF*; 10: *sfaS*; 11: *focG*; 12: *bmæE*; 13: *hna*; 14: *eaI*  
**Eisenaufnahmesysteme:** 1: *feoB*; 2: *fyuA*; 3: *irp2*; 4: *sif chr*; 5: *sitA*; 6: *iroN*; 7: *iucD*; 8: *iutA*; 9: *sif ep*; 10: *chuA*; 11: *ireA*; 12: *eilA*; 13: *eilC*  
**Invasive:** 1: *kpsMTII*; 2: *ibea*; 3: *ompA*; 4: *ompT*; 5: *iss*; 6: *tia*; 7: *neuC*; 8: *traT*; 9: *escv*  
**Toxine:** 1: *cnf1/2*; 2: *vat*; 3: *hlyA*; 4: *hlyC*; 5: *sat*; 6: *hlyF*; 7: *aslA*; 8: *coV*  
**Diverse:** 1: *etsC*; 2: *Rpai (malX)*; 3: *pks*; 4: *gimB*; 5: *pic*; 6: *etsB*; 7: *cvaC*

Tabelle 28: Übersicht über Herkunft der F-ST648-E. coli-Isolate und deren virulenzassoziierte Gene

IHIT-Nr.	Probenmaterial	Tierart	Virulenzassoziierte Gene nach Kategorien			
			Adhäsine	Eisenaufnahmesysteme	Invasive/Protektine	Toxine
22921	Tupfer Bauchhöhle	Pferd	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-
22927	Kot	Esel	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-
22988	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23002	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23012	Nahtfistel	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23019	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
22990	ZVK-Spüllösung	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23002	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23010	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23012	Nahtfistel	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23019	Urin	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23044	Wunde	Hund	3, 4, 5	1, 3, 10	1, 3, 8	-
23161	Nase	Kalb	3, 4, 5	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10	1, 3, 8	-
23167	Organe	Pferd	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-
23174	Kot	Pferd	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-
23176	Zunge	Pferd	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-
23177	Kot	Kalb	3, 4, 5	1, 10	1, 3, 8	-

**Adhäsine:** 1: *sfa/foc*; 2: *papC*; 3: *fimC*; 4: *csgA*; 5: *mat*; 6: *papAH*; 7: *iha*; 8: *papG/II*; 9: *papEF*; 10: *sfaS*; 11: *focG*; 12: *bnaE*; 13: *hra*  
**Eisenaufnahmesysteme:** 1: *feoB*; 2: *fyuA*; 3: *irp2*; 4: *sit chr*; 5: *slfA*; 6: *iroN*; 7: *lucD*; 8: *iutA*; 9: *sif ep*; 10: *chuA*; 11: *ireA*; 12: *eitA*; 13: *eitC*  
**Invasive:** 1: *kpsMT/II*; 2: *ibcA*; 3: *ompA*; 4: *ompT*; 5: *iss*; 6: *tia*; 7: *neuC*; 8: *tra T*  
**Toxine:** 1: *cnf1/2*; 2: *vat*; 3: *hlyA*; 4: *hlyC*; 5: *sat*; 6: *hlyF*; 7: *astA*  
**Diverse:** 1: *elsC*; 2: *RpaI (malX)*; 3: *pks*; 4: *gimB*; 5: *pic*; 6: *elsB*; 7: *ovaC*

### 2.3.2 *K. pneumoniae*

Unter den 54 phänotypisch bestätigten ESBL-bildenden und AmpC-verdächtigen *K. pneumoniae*-Isolaten wurden mittels MLST neun verschiedene ST ermittelt werden. Von diesen Isolaten gehörten 57,4 % zu dem ST15, 18,5 % zum ST11. Jeweils 7,4 % der Isolate entfielen auf den ST132 und ST895 und fünf Isolate erschienen als Singletons (Abbildung 14).

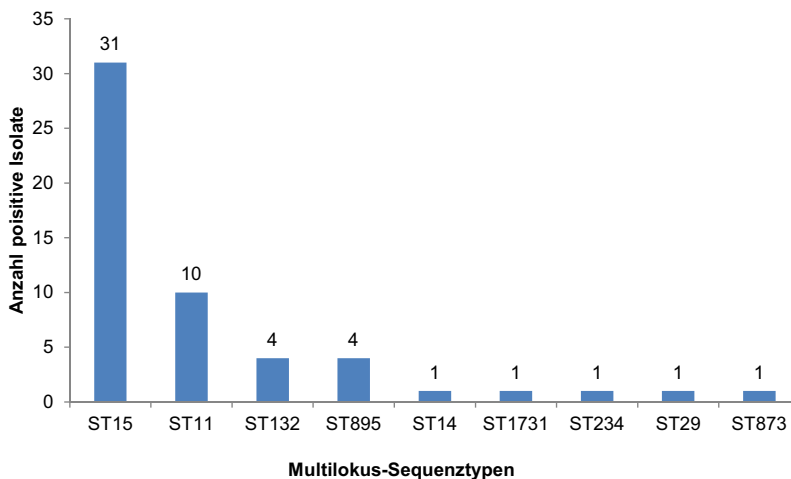


Abbildung 14: Verteilung der Sequenztypen bei *K. pneumoniae*-Isolaten

### 3. Carbapenemase-produzierende *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate

#### 3.1 Phänotypische Charakterisierung

##### 3.1.1 *E. coli*

Die 3582 unter 1.1 genannten *E. coli*-Isolate wurden auf eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen gescreent. In dem Screeningmedium zeigten fünf Isolate ein Wachstum und konnten mittels MHT phänotypisch als Carbapenemase-Bildner bestätigt werden. Zwei von ihnen (Isolat 2 und 3) konnten zudem als ESBL-Bildner phänotypisch bestätigt werden, die anderen drei (Isolate 1, 4 und 5) verhielten sich im „confirmatory test“ AmpC-verdächtig. Sie stammten alle aus verschiedenen Lokalisationen von Hunden, die in derselben Abteilung einer Tierklinik behandelt wurden (Tabelle 29).

Für alle fünf Isolate wurde die MHK gegenüber 18 verschiedenen Antibiotika mittels VITEK2-System bestimmt. Sofern verfügbar wurden zur Auswertung klinische Grenzwerte nach CLSI, wie unter 2.1.5.2 beschrieben, zugrunde gelegt.

Es konnte bei allen Isolaten eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Amoxicillin-Clavulansäure und Piperacillin, Cefalexin und Ceftiofur festgestellt werden. Mit Ausnahme von Isolat IHIT22714 waren alle Carbapenemase-bildenden *E. coli*-Isolate außerdem resistent gegenüber Cefpodoxim. Zusätzlich wiesen alle Isolate eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Enro- und Marbofloxacin auf. Mit Ausnahme von IHIT22064 trat bei allen Isolaten eine Resistenz gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol auf, mit Ausnahme von IHIT22714 zusätzlich gegenüber Tetracyclin und Chloramphenicol. Für Imipenem ergab sich für alle fünf Isolate eine MHK von  $\leq 1$  mg/L, was einer vollständigen Empfindlichkeit gegenüber diesem Wirkstoff entspricht (Tabelle 50). Die Sensibilität der Isolate gegenüber Imipenem wurde zusätzlich mittels eines Epsilometertests der Firma bioMérieux unter Berücksichtigung der CLSI-Grenzwerte [236] für Imipenem bestätigt.

Tabelle 29: Klinische Daten zu den Trägern von OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolaten und Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung

Isolat-Nr.	Datum der Isolierung	IHIT-Nr.	Keimgehalt (OXA-48-Bildner)	Probenherkunft	Tierart/ Individuum <sup>1</sup>	Abteilung <sup>2</sup>	Weitere aus der Probe isolierte Erreger und deren Keimgehalt	Komorbiditätsfaktoren
1	11.06.2012	22060	++	Wunde	Hund 1	A	<i>K. pneumoniae</i> (OXA-48-Bildner) +++ β-hämolysierende Streptokokken +++ <i>Acinetobacter baumannii</i> +	chronische Otitis, Mammatumor, ventrikuläre Tachykardie
2	12.06.2012	22062	+	BAL	Hund 2	A	alpha-hämolysierende Streptokokken + <i>K. pneumoniae</i> +	eosinophile Pneumonie
3	25.09.2012	22064	+++	Kot	Hund 5	A	<i>Enterococcus</i> sp. +++ alpha-hämolysierende Streptokokken ++	Portosystemischer Shunt, Zystitis
4	05.11.2012	22714	++	Blutkultur	Hund 8	A	Keine	k. A.
5	05.11.2012	22718	+	Abszess	Hund 9	A	alpha-hämolysierende Streptokokken +++ <i>K. pneumoniae</i> + <i>Proteus</i> sp. +	Ösophagusdilatation, Ileus nach Fremdkörper

(+): 0-5 Kolonien; +: 5-50 Kolonien; ++: 50-250 Kolonien; +++: > 250 Kolonien  
1: Die Durchnummerierung der einzelnen Individuen erfolgte chronologisch nach Zeitpunkt der Isolierung der OXA-48bildenden *E. coli*-Isolate  
2: Abteilung A: Klinik für Kleintiere, Bereich Innere Medizin, JLU Gießen  
BAL: Bronchoalveoläre Lavage



### 3.1.2 *Klebsiella* spp.

Die unter 1.2 genannten 457 *K. pneumoniae*- und die 132 *K. oxytoca*-Isolate wurden auf eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen getestet. 36 Isolate (darunter ein *K. oxytoca*-Isolat) zeigten ein Wachstum in der Screeningmethode und konnten anschließend mittels des MHT als Carbapenemase-Bildner bestätigt werden.

Siebzehn *K. pneumoniae*-Isolate zeigten darüber hinaus im ESBL- „confirmatory test“ einen ESBL-, neun Isolate und das *K. oxytoca*-Isolat einen für AmpC-Bildung verdächtigen Phänotyp und 10 Isolate konnten weder als ESBL-Bildner noch als AmpC-verdächtig identifiziert werden. Einen Überblick über alle Carbapenemase-bildenden *Klebsiella* spp.-Isolate enthält Tabelle 30.

Für alle Carbapenemase-bildenden *Klebsiella* spp.-Isolate wurde mittels VITEK2-System die MHK gegenüber 18 verschiedenen Antibiotika bestimmt. Alle 35 Isolate erwiesen sich als resistent gegenüber Ampicillin, Amoxicillin-Clavulansäure, Piperacillin, Cefalexin, Enro- und Marbofloxacin. 74,3 % der Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Ceftiofur, 54,3 % bzw. 28,6 % eine Resistenz gegenüber Cefpirom bzw. Cefpodoxim. Unempfindlichkeiten gegenüber Gentamicin, Tobramycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Chloramphenicol, Cefpirom und Nitrofurantoin konnten bei 25 bis 36,1 % der Isolate nachgewiesen werden (Tabelle 50). Bei keinem Isolat konnte eine Resistenz gegenüber Polymyxin B festgestellt werden. Gegenüber Imipenem erwiesen sich 20 Isolate (55,6 %) als resistent, 12 weitere Isolate (33,3 %) zeichneten sich durch eine intermediäre Empfindlichkeit aus. Vier Carbapenemase-produzierende *Klebsiella* spp.-Isolate (11,1 %) zeigten in der MHK-Testung eine vollständige Empfindlichkeit gegenüber Imipenem (Tabelle 32). Die Sensibilität dieser vier Isolate gegenüber Imipenem wurde zusätzlich mittels eines Epsilometertests der Firma bioMérieux unter Berücksichtigung der CLSI-Grenzwerte für Imipenem bestätigt [236].

Tabelle 30: Klinische Daten zu den Trägern OXA-48-bildender *Klebsiella* spp.-Isolate und Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	Datum der Isolierung	Keimgehalt (OXA-48-Bildner)	Probenherkunft	Tierart/Individuum	Abteilung <sup>1</sup>	Weitere aus der Probe isolierte Erreger und deren Keimgehalt	Komorbiditätsfaktoren
1	22059	11.06.2012	+++	Wunde	Hund 1	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> + <i>Streptococcus canis</i> +++ <i>E. coli</i> (OXA-48-Bildner) ++	chronische Otitis, Mammatumor, ventrikuläre Tachykardie
2	22061	12.06.2012	+	BAL	Hund 2	A	alpha-hämolyisierende Streptokokken + <i>E. coli</i> (OXA-48-Bildner) +	eosinophile Pneumonie
3	22063	22.08.2012	+	Ösophagussonde	Hund 3	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> +++, <i>Enterococcus</i> sp. +	Makroadenom der Schilddrüse
4	22065	25.09.2012	+++	Urin	Hund 4	A	Keine	Portosystemischer Shunt, Zystitis
5	22721	01.10.2012	+	ZVK	Hund 4	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> + γ-hämolyisierende Streptokokken +	intrahepatischer Lebershunt, ggr. Mitralklappeninsuffizienz
6	22066	06.10.2012	+	ZVK	Hund 6	A	<i>E. coli</i> ++, <i>A. baumannii</i> +, <i>Citrobacter freundii</i> +, <i>Morganella morganii</i> + <i>Acinetobacter baumannii</i> +	k. A.
7	22715	22.10.2012	+++	Urin	Hund 7	B		Harnröhrendefekt, Wundinfektion, Durchfall
8	22719	24.10.2012	+++	Urin	Hund 7	B	<i>E. coli</i> +++ (ESBL-Bildner)	Harnröhrendefekt, Wundinfektion, Durchfall
9*	25329	29.11.2012	+++	Urin	Hund 10	B	<i>E. coli</i> +++ (ESBL-Bildner)	Bissverletzung
10	22720	07.12.2012	+++	Urin	Hund 11	B	coliforme Keime +	Blasensteine, Trachealkollaps

Fortsetzung der Tabelle 30

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	Datum der Isolierung	Keimgehalt (OXA-48-Bildner)	Probenherkunft	Tierart/Individuum	Abteilungs <sup>1</sup> lung <sup>2</sup>	Weitere aus der Probe isolierte Erreger und deren Keimgehalt	Komorbiditätsfaktoren
11	22722	02.01.2013	+++	Urin	Hund 12	A	Keine	Zystitis, Orchitis, Urethradefekt
12	22723	02.01.2013	+++	Haut	Hund 13	A	β-hämolisierende Streptokokken + <i>E. coli</i> ++ (ESBL-verdächtig) <i>Enterococcus</i> sp. ++	Pyodermie, Lungenfibrose
13	22716	18.01.2013	+	Prostatazyste	Hund 14	B	SIG+++ (MRS-verdächtig) <i>E. coli</i> var haem +++	Septikämie, Prostataabszess, Discopathie
14	22717	18.01.2013	+++	Urin	Hund 14	B	<i>E. coli</i> + (ESBL-verdächtig) <i>E. coli</i> (β-Hämolyse) +++ <i>Enterococcus</i> sp. ++	Septikämie, Prostataabszess, Discopathie
15	23256	06.06.2013	++	Prostatazyste	Hund 15	A	<i>E. coli</i> ++, <i>Enterococcus</i> sp. + <i>Nocardia</i> sp. (+)	Bandscheibenvorfall, Prostataabszess
16	24181	19.06.2013	+++	Tracheotubus	Hund 16	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> ++ <i>Enterobacter cloacae</i> +++ <i>Pseudomonas</i> sp. +++	persistierender Ductus arteriosus, AV-Block 2. Grades
17	24183	25.06.2013	+	Wunde	Hund 17	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> ++ <i>Enterobacter cloacae</i> + (ESBL-verdächtig) <i>Staphylococcus</i> sp. ++ <i>Enterococcus</i> sp. +	Kehlkopfkollaps
18	23257	01.07.2013	+	Abdomen	Hund 18	B		septische Peritonitis nach Entfernung Leiomyom
19	24182	10.07.2013	+	Abdomen	Hund 18	B	<i>E. coli</i> + (ESBL-verdächtig)	septische Peritonitis nach Entfernung Leiomyom
20	24184	17.07.2013	+	Haut	Hund 19	A	<i>Enterobacter cloacae</i> (+) SIG +++ (MRS-verdächtig) <i>Proteus mirabilis</i> (ESBL-verdächtig) +, <i>Neisseria</i> sp. +, <i>Pseudomonas</i> sp. ++	Infektion mit Lungenwürmern

Fortsetzung der Tabelle 30

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	Datum der Isolierung	Keimgehalt (OXA-48-Bildner)	Probenherkunft	Tierart/Individuum	Abteilung <sup>1</sup> lung <sup>2</sup>	Weitere aus der Probe isolierte Erreger und deren Keimgehalt	Komorbiditätsfaktoren
21	24178	24.07.2013	+++	Abdomen	Hund 20	B	Keine	Urolithiasis, Blasenruptur
22	24185	06.08.2013	+++	Gewebe Bein	Hund 21	A	<i>Acinetobacter baumannii</i> ++, <i>γ</i> -hämolyisierende Streptokokken (+), <i>Morganella morganii</i> (+)	persistierender Ductus arteriosus
23	24186	19.08.2013	++	ZVK	Hund 22	A	Keine	extrahepatischer Leber-shunt
24	24187	19.08.2013	+++	Abdomen	Hund 23	A	Keine	Nierenversagen nach Hitzschlag, Pneumonie, Enteritis, fibrinös-eitrige Endokarditis
25	24179	06.09.2013	+	Urin	Hund 24	A	Keine	Gastroenteritis, Konjunktivitis, Zystitis
26	24188	01.10.2013	+	Wunde	Hund 25	A	<i>E. coli</i> (+) (ESBL-verdächtig)	extrahepatischer Leber-shunt, Hornhautulkus Auge
27	24171	18.10.2013	+++	Drainage	Hund 26	B	<i>Acinetobacter baumannii</i> +	Fraktur
28	24170	18.10.2013	+++	Wunde	Hund 26	B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> +	Fraktur
29	24172	11.11.2013	+	Urin	Katze 1	B	<i>E. coli</i> + (ESBL-verdächtig)	Autounfall
30	24175	11.11.2013	+++	Urin	Hund 27	B	Keine	Zystitis, ektopischer Ureter

Fortsetzung der Tabelle 30

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	Datum der Isolierung	Keimgehalt (OXA-48-Bildner)	Probenherkunft	Tierart/Individuum <sup>1</sup>	Abteilung <sup>2</sup>	Weitere aus der Probe isolierte Erreger und deren Keimgehalt	Komorbiditätsfaktoren
31	24177	19.11.2013	++	Fettgewebsnekrose	Katze 2	B	<i>Anaerococcus prevotii</i> +++ <i>E. coli</i> +++ (ESBL-verdächtig)	Zwerchfellruptur, Tarsalfraktur
32	25322	02.01.2014	+++	Wunde	Hund 28	B	Keine	Trauma
33	25323	02.01.2014	+	Urin	Hund 29	B	Keine	Cystolithiasis
34	25324	02.01.2014	+	Urin	Hund 30	B	Keine	Rektumprolaps, Prostatazysten
35	25327	20.01.2014	+	Urin	Hund 30	B	Keine	Rektumprolaps, Prostatazysten
36	25328	20.01.2014	++	Podofurunkel	Hund 31	B	<i>Streptococcus canis</i> +; <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> +++ <i>Corynebacterium auriscanis</i> +; <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> sp. +	k. A.

1: Die Durchnummerierung der einzelnen Individuen erfolgte chronologisch nach Zeitpunkt der Isolierung der OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate

2: Abteilung A: Klinik für Kleintiere, Bereich Innere Medizin, JLU Gießen; Abteilung B: Klinik für Kleintiere, Bereich Chirurgie, JLU Gießen

(+): 0-5 Kolonien; ++: 5-50 Kolonien; +++: 50-250 Kolonien; ++++: > 250 Kolonien

SIG: *Staphylococcus intermedius*-Gruppe; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; ZVK: Zentraler Venenkatheter

## 3.2 Genotypische Charakterisierung

### 3.2.1 Nachweis von $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Genen

#### 3.2.1.1 *E. coli*

Alle fünf phänotypisch als Carbapenemase-Bildner bestätigten *E. coli*-Isolate konnten mittels PCR und Sequenzanalyse als OXA-48-Bildner identifiziert werden. Die Isolate 1 und 2 (Tabelle 31) wiesen zudem eine Kombination aus dem ESBL-Gen *bla*<sub>SHV-12</sub> und dem AmpC-Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> auf. Bei diesen Isolaten konnten des Weiteren die  $\beta$ -Laktamasen TEM-1 und OXA-1 nachgewiesen werden. Isolat 3 verhielt sich ähnlich, hier fehlte jedoch die ESBL SHV-12. Isolat 4 besaß die ESBL CTX-M-15 in Kombination mit TEM-1 und OXA-2 und bei Isolat 5 konnten weder ein ESBL- noch ein AmpC-Gen, dafür aber *bla*<sub>TEM-1</sub> und *bla*<sub>SHV-1</sub> nachgewiesen werden (Tabelle 31).

Die Isolate 1-3 besaßen zudem das Qnr-Protein QnrB2 und das Isolat 4 die Effluxpumpe OqxA. Bei Isolat 5 konnte kein PMQR-Mechanismus nachgewiesen werden.

#### 3.2.1.2 *Klebsiella* spp.

Alle 36 phänotypisch als Carbapenemase-Bildner bestätigten *Klebsiella* spp.-Isolate konnten mittels PCR und Sequenzanalyse ebenfalls als OXA-48-Bildner bestätigt werden. Eine Gruppe von 10 *K. pneumoniae*-Isolaten besaß zusätzlich eine Kombination aus der ESBL CTX-M-15 und den  $\beta$ -Laktamasen SHV-28, TEM-1 und OXA-1. Eine ähnliche Kombination jedoch ohne TEM-1 und mit SHV-1 anstelle von SHV-28 konnte bei einer Gruppe von weiteren fünf Isolaten nachgewiesen werden. Zehn Isolate besaßen lediglich die  $\beta$ -Laktamase SHV-28. Die übrigen 10 *K. pneumoniae*-Isolate waren positiv für *bla*<sub>SHV-11</sub> in Kombination mit *bla*<sub>DHA-1</sub> und zum Teil mit *bla*<sub>OXA-1</sub> (Tabelle 32).

Alle 35 OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate besaßen mindestens einen PMQR-Mechanismus. Bei sieben dieser Isolate konnte *oqxA*, bei 28 Isolaten sowohl *oqxA* als auch *oqxB* detektiert werden. Zwölf Isolate besaßen zudem die cr-Variante der Aminoglykosid-Acetyltransferase *Aac*(6')-Ib. Bei weiteren 11 Isolaten konnte das QnrB4-Gen nachgewiesen werden (Tabelle 32).

Das OXA-48-bildende *K. oxytoca*-Isolat besaß weder zusätzliche  $\beta$ -Laktamase- noch PMQR-Gene.

Tabelle 31: Phänotypische und genotypische Charakteristika OXA-48-bildender *E. coli*-Isolate (chronologisch gelistet)

Isolat-Nr.	Datum der Isolierung	IHIT-Nr.	ST	PFGE-Typ	β-Laktamase-Gene	PMQR-Gene	Plasmidgrößen in kb <sup>1</sup>	Resistenz <sup>2</sup> gegenüber	Empfindlichkeit gegenüber Imipenem	
									mg/L	Interpretation
1	11.06.2012	22060	1196	Ec-A	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-2</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>qmrB2</i>	60, 130, 290	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, GEN, TOB, ENR, MBX, TET, CHL, SXT	≤1	S
2	12.06.2012	22062	1196	Ec-A	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-2</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>qmrB2</i>	60, 130, 290	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, GEN, TOB, ENR, MBX, TET, CHL, SXT	≤1	S
3	05.11.2012	22714	1196	Ec-A	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>qmrB2</i>	60, 130, 290	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, ENR, MBX, TET, CHL	≤1	S
4	25.09.2012	22064	1431	Ec-B	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>oqxA</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, SXT	≤1	S
5	05.11.2012	22718	410	Ec-C	<i>bla<sub>SHV-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	-	60, 130	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, TET, CHL, SXT	≤1	S

1: ermittelt mittels Plasmidpräparation

2: ermittelt mittels VITEK®-MHK-Testung (Auswertung erfolgt wie unter 2.1.5.2 beschrieben)

ST: Sequenztyp, AMC: Amoxicillin-Clavulansäure, AMP: Ampicillin, PIP: Piperacillin, CFX: Cefalexin, CFD: Cefpodoxim, CFT: Ceftriaxol, CFP: Cefpirom, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin  
ENR: Enrofloxacin, MBX: Marbofloxacin, TET: Tetracyclin, CHL: Chloramphenicol, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazol  
S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

Tabelle 32: Phänotypische und genotypische Charakteristika OXA-48-bildender *K. pneumoniae*-Isolate (chronologisch gelistet)

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	ST	PFGE-Typ	β-Laktamase-Gene	PMQR-Gene	Plasmidgrößen in kb <sup>1</sup>	Resistenz <sup>2</sup> gegenüber	Empfindlichkeit gegenüber Imipenem	
								mg/L	Interpretation
1	22059	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, GEN, TOB, ENR, MBX, SXT	2	I
2	22061	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, GEN, TOB, ENR, MBX, SXT	2	I
3	22063	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, GEN, TOB, ENR, MBX, SXT	2	I
4	22065	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, GEN, TOB, ENR, MBX, NFT, SXT	≥16	R
5	22721	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, GEN, TOB, ENR, MBX, NFT, SXT	>16	R
6	22066	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, GEN, TOB, ENR, MBX, SXT	2	I
7	22715	11	C2	<i>bla</i> <sub>SHV11</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i>	60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, TET, NFT, CHL, SXT	2	I
8	22719	15	D1	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, IMP, GEN, TOB, ENR, MBX, SXT	4	R
9*	25329	nt	-	-	-	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, IMP, ENR, MBX, TET, CHL, SXT	8	R
10	22720	15	D2	<i>bla</i> <sub>SHV28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, TOB, ENR, MBX, SXT	2	I



## Fortsetzung der Tabelle 32

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	ST	PFGE-Typ	β-Laktamase-Gene	PMQR-Gene	Plasmidgrößen in kb <sup>1</sup>	Resistenz <sup>2</sup> gegenüber	Empfindlichkeit gegenüber Imipenem	
								mg/L	Interpretation
11	22722	15	D1	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, GEN, TOB, ENR, MBX, NFT, SXT	≥16	R
12	22723	15	D1	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	50, 60, 75, 100	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, GEN, TOB, ENR, MBX, TET, CHL, SXT	4	R
13	22716	11	C1	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i> , <i>bla<sub>DHA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i>	60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, IMP, ENR, MBX, TET, NFT, CHL	8	R
14	22717	11	C1	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i> , <i>bla<sub>DHA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i>	60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, TET, NFT	≤1	S
15	23256	15	F2	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	<i>oxxA/B</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	4	R
16	24181	15	F2	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	<i>oxxA/B</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	4	R
17	24183	15	F2	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	<i>oxxA/B</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	4	R
18	23257	11	A	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i> , <i>bla<sub>DHA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, ENR, MBX, TET, NTF, CHL	≤1	S
19	24182	15	F2	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	8	R
20	24184	15	F2	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	8	R

Fortsetzung der Tabelle 32

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	ST	PFGE-Typ	β-Laktamase-Gene	PMQR-Gene	Plasmidgrößen in kb <sup>1</sup>	Resistenz <sup>2</sup> gegenüber	Empfindlichkeit gegenüber Imipenem	
								mg/L	Interpretation
21	24178	11	A	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, TET, NTF, CHL	≤1	S
22	24185	15	F2	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	8	R
23	24186	15	F2	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	8	R
24	24187	15	F2	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, ENR, MBX	4	R
25	24179	11	A	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, ENR, MBX, TET, NTF, CHL	2	I
26	24188	15	F2	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, IMP, ENR, MBX	4	R
27	24171	15	E	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	40, 60, 95, 200	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, ENR, MBX, TET	4	R
28	24170	15	E	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	40, 60, 95, 200	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, IMP, ENR, MBX, TET	4	R
29	24172	15	F1	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	40, 60, 95, 200	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, ENR, MBX	2	I
30	24175	895	B	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i>	30, 60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, ENR, MBX, TET, NTF, CHL, SXT	≤1	S

Fortsetzung der Tabelle 32

Isolat-Nr.	IHIT-Nr.	ST	PFGE-Typ	β-Laktamase-Gene	PMQR-Gene	Plasmidgrößen in kb <sup>1</sup>	Resistenz <sup>2</sup> gegenüber	Empfindlichkeit gegenüber Imipenem	
								mg/L	Interpretation
31	24177	15	F1	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	30, 60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, ENR, MBX	2	I
32	25322	15	F1	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	30, 60, 210	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, CFP, ENR, MBX, TET	2	I
33	25323	11	A	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, ENR, MBX, TET, NFT, CHL	4	R
34	25324	11	A	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, ENR, MBX, TET, NFT, CHL	2	I
35	25327	11	A	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>oxxA/B</i> , <i>qnrB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	60	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, ENR, MBX, TET, NTF, CHL	2	I
36	25328	15	F2	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>oxxA</i>	20, 45, 60, 100, 140	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, ENR, MBX	4	R

\*K. oxytoca

1: ermittelt mittels Plasmidpräparation

2: ermittelt mittels VITEK®-MHK-Testung (Auswertung erfolgt wie unter 2.1.5.2 beschrieben)

ST: Sequenztyp, AMC: Amoxicillin-Clavulansäure, AMP: Ampicillin, PIP: Piperacillin, CFX: Cefalexin, CFD: Cefpodoxim, CFT: Ceftiofur, CFP: Ceftiofur, GEN: Gentamicin, T Tobramycin, ENR: Enrofloxacin, MBX: Marbofloxacin, TET: Tetracyclin, NFT: Nitrofurantoin, CHL: Chloramphenicol, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazol; nt: nicht typisiert  
S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

### **3.3 Untersuchungen zur Phylogenie und Klonalität mittels Multilokus-Sequenz-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese**

#### **3.3.1 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)**

##### **3.3.1.1 *E. coli***

Mittels MLST konnte festgestellt werden, dass die Isolate 1 bis 3 demselben ST angehörten (ST1196), wohingegen Isolat 4 und 5 jeweils einem anderen ST zuzuordnen waren (ST1431 bzw. ST410) (Tabelle 31). Als Grundlage für die Auswertung diente die *E. coli*-MLST-Datenbank der University of Warwick, England (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

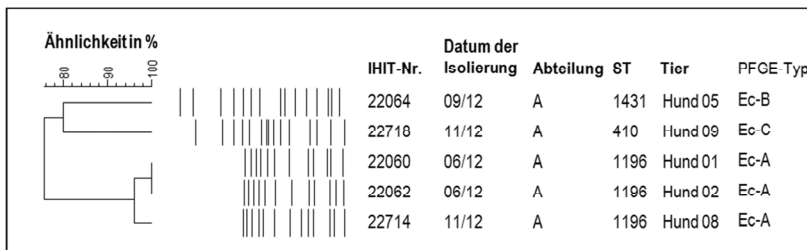
##### **3.3.1.2 *K. pneumoniae***

Auch alle OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate wurden mittels MLST einem ST zugeordnet. Dabei dominierte der ST15 mit 25 Isolaten, gefolgt von dem ST11 (n=9) und dem ST895 (n=1) (Tabelle 32). Als Grundlage für die Auswertung diente die *K. pneumoniae*-MLST-Datenbank (<http://bigsd.db.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) des Institute Pasteur, Frankreich.

#### **3.3.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

##### **3.3.2.1 *E. coli***

Zur Bestimmung der klonalen Verwandtschaft der OXA-48-bildenden *E. coli*-Stämme wurde eine PFGE (2.3.4.3) durchgeführt. Den einzelnen PFGE-Typen wurden in dieser Arbeit Großbuchstaben zugeordnet (A, B, C, D, usw.). Eventuelle PFGE-Subpopulationen wurden durchnummeriert (z. B. A1, A2, A3, usw.) [245]. Innerhalb der fünf OXA-48-positiven Isolate konnten vier Restriktionsmuster ausgemacht werden. Das Auswertungsschema nach Tenover [245] zugrunde gelegt, wiesen die Isolate IHIT22060 und IHIT22062 zu 100 % identische Restriktionsmuster auf. Isolat IHIT22714 besaß eine zusätzliche Bande und zeigte somit 96 % Identität mit den beiden genannten Isolaten (Abbildung 15). Die Zugehörigkeit aller Isolate zum ST1196 unterstrich das Ergebnis. IHIT22064 und IHIT22718 wiesen unterschiedliche Restriktionsprofile mit > 6 unterschiedlichen Banden auf, sodass sie zueinander nur zu 80 % und zu den übrigen Isolaten weniger als 80 % identisch waren (Abbildung 15). Sie galten somit bei den gewählten Kriterien als nicht verwandt.



**Abbildung 15: Dendrogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile der OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolate**

Erstellt mit BioNumerics®; Ähnlichkeiten kalkuliert mit Dice similarity index; Toleranz: 2 %, Optimierung: 1,5 %. Abteilung A: Klinik für Kleintiere, Bereich Innere Medizin, JLU Gießen

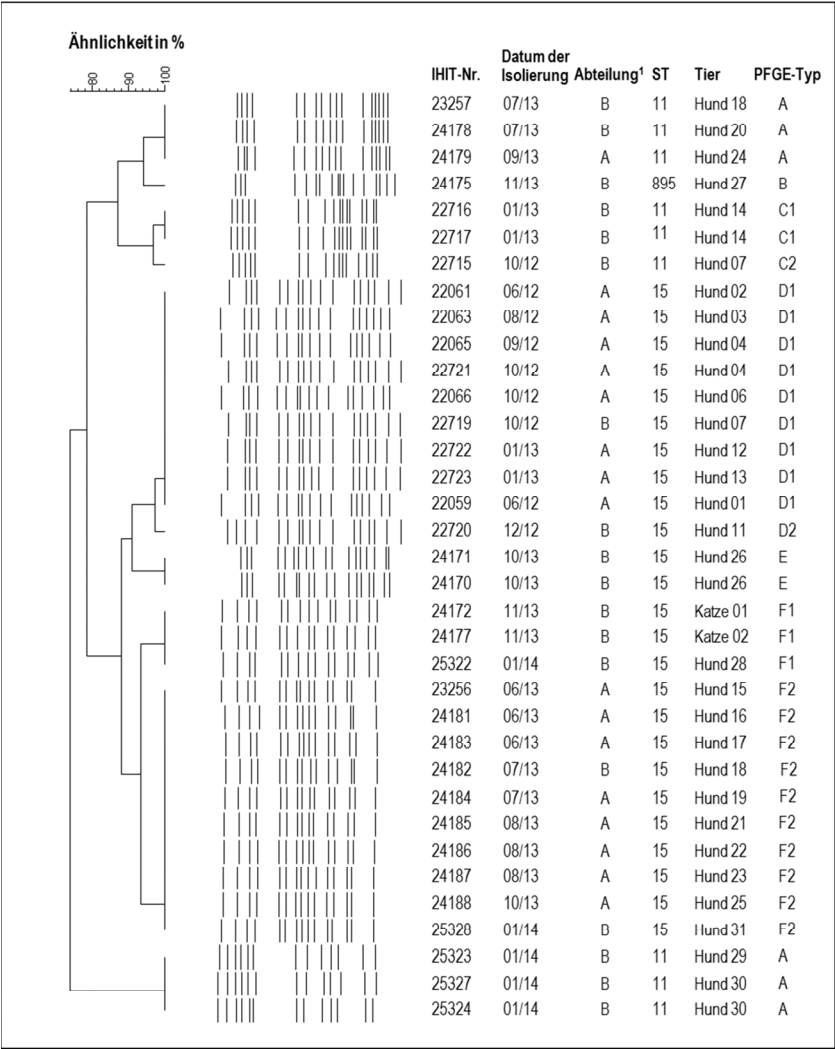
### 3.3.2.2 *K. pneumoniae*

Auch die OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate wurden einer Makrorestriktionsanalyse mittels PFGE unterzogen. Durch die Behandlung mit XbaI konnten 10 Restriktionsprofile innerhalb der 35 Isolate identifiziert werden. Diese 10 Restriktionsprofile konnten in sieben PFGE-Typen eingeteilt werden, wobei die einzelnen Mitglieder eines Typs zu mindestens 94 % identisch waren (Abbildung 16). Die PFGE-Typen A, B, C und G waren dem ST11 und dem ST895 zugehörig, die Typen D-F dem ST15.

Die Isolate IHIT23257, IHIT24178, IHIT24179, IHIT25323, IHIT25327 und IHIT25324 wiesen das gleiche Restriktionsprofil auf und bildeten den PFGE-Typ A. Als dem ST11 zugehörig wiesen sie neben den  $\beta$ -Laktamasen SHV-11 und der OXA-Gruppe-1 die AmpC DHA-1 und die PMQR-Mechanismen OqxA, OqxB, QnrB4 und Aac(6')-Ib-cr auf.

Der PFGE-Typ B wurde von einem einzelnen ST895-Isolat dargestellt. Es exprimiert mit Ausnahme der cr-Variante der Aminoglykosid-Acetyltransferase und der OXA-Gruppe-1 die gleichen  $\beta$ -Laktamasen und PMQR-Mechanismen wie die Mitglieder des PFGE-Typs A.

Der PFGE-Typ C bestand aus zwei PFGE-gleichen Isolaten (IHIT22716 und IHIT22717, Subpopulation C1) und einem Isolat (IHIT22715, Subpopulation C2), das sich in zwei Banden von den anderen beiden Isolaten unterschied (97 % Ähnlichkeit). Sie besaßen alle die Gene *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB4* und *oqxA/B*, die Isolate IHIT22716 und IHIT22717 zusätzlich noch das Gen *bla*<sub>TEM-1</sub>.



**Abbildung 16: Dendrogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile der OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate**

Erstellt mit BioNumerics®; Ähnlichkeiten kalkuliert mit Dice similarity index; Toleranz: 4 %, Optimierung: 1 %

1: Abteilung A: Klinik für Kleintiere, Bereich Innere Medizin, JLU Gießen; Abteilung B: Klinik für Kleintiere, Bereich Chirurgie, JLU Gießen

Der PFGE-Typ D umfasste neun Isolate (IHIT22061, IHIT22063, IHIT22605, IHIT22721, IHIT22066, IHIT22719, IHIT22722, IHIT22723, IHIT22059), die in ihrem Restriktionsprofil (D1) zu 100 % identisch waren. Isolat IHIT22720 zeigte in seinem Restriktionsprofil (D2) einen Unterschied in einer Bande und war zu 97 % identisch mit den übrigen Isolaten der Gruppe. Die Isolate des PFGE-Typs D besaßen die ESBL CTX-M-15, die  $\beta$ -Laktamasen TEM-1, SHV-28 und OXA-Gruppe-1 und die PMQR-Mechanismen OqxA/B und  $\text{Aac}(6')\text{-Ib-cr}$ .

Der PFGE-Typ E wurde von zwei Stämmen (IHIT24171 und 24170) repräsentiert, deren Makrorestriktionsprofile zu 100 % identisch waren. Sie wiesen ein ähnliches Spektrum an  $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Genen auf wie der PFGE-Typ-D. Statt *bla*<sub>SHV-28</sub> besaßen sie allerdings *bla*<sub>SHV-1</sub> und *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte nicht nachgewiesen werden.

Dem PFGE-Typ F gehörten zwei Subpopulationen an. F1 wurde von drei Isolaten (IHIT24172, IHIT24177, IHIT25322) gebildet. Sie wiesen ein 100 % identisches Restriktionsprofil auf. Bei diesen Isolaten konnten CTX-M-15, SHV-28 und OXA-Gruppe-1 sowie die PMQR-Mechanismen OqxA/B und  $\text{Aac}(6')\text{-Ib-cr}$  nachgewiesen werden. Zehn weitere, zu 100 % in ihrem Restriktionsprofil identische Isolate, bildeten die Subpopulation F2. Bei diesen konnte neben der  $\beta$ -Laktamase SHV-28 nur die Effluxpumpe OqxA/B nachgewiesen werden. Die Gruppe F2 unterschied sich in zwei Banden von der Gruppe F1.

### 3.4 Charakterisierung des OXA-48-Plasmids

#### 3.4.1 Übertragbarkeit des Plasmids in Transkonjugationsversuchen

Bei allen fünf *bla*<sub>OXA-48</sub>-positiven *E. coli*-Isolaten konnte das OXA-48-Plasmid mittels Transkonjugation in vitro auf den Rezipientenstamm *E. coli* J53 übertragen werden. Bei den Isolaten IHIT22064 und IHIT22062 ist neben dem OXA-48-Plasmid ein weiteres, *bla*<sub>TEM-1</sub>-tragendes Plasmid von dem Rezipientenstamm aufgenommen worden.

Bei den *K. pneumoniae*-Isolaten wurden stellvertretend für jede Gruppe der ST15- und ST11-Isolate je ein oder mehrere Isolate im Transkonjugationsversuch getestet. Nur bei dem ST895-*K. pneumoniae*-Isolat war der Versuch auch nach der dritten Durchführung nicht erfolgreich. Bei den übrigen Isolaten, so auch bei dem *K. oxytoca*-Isolat, gelang es, ausschließlich das OXA-48-Plasmid zu transkonjugieren, was mittels PCR, Plasmidpräparation und MHK-Wert-Bestimmung überprüft wurde. Alle vorhandenen Transkonjuganten (TK) sind in Tabelle 33 gelistet.

#### 3.4.2 MHK-Wert-Bestimmung der OXA-48-TK

Alle TK wurden einer MHK-Bestimmung mittels VITEK unterzogen, um Resistenzen, die mit dem OXA-48-Plasmid verknüpft sind und auf den Empfängerstamm übertragen wurden,

nachzuweisen. Während sich der Rezipientenstamm *E. coli* J53 nur dem Wirkstoff Cefalexin gegenüber als eingeschränkt empfindlich erwies, waren alle TK resistent gegenüber Amoxicillin, Amoxicillin-Clavulansäure und Piperacillin. Ein Großteil der TK (85,7%) zeigte eine Resistenz gegenüber Cefalexin, zwölf der insgesamt 21 TK besaßen zudem eine Resistenz gegenüber Ceftiofur. Mit Ausnahme der TK19 konnte bei keiner TK eine Resistenz gegenüber Cefpodoxim festgestellt werden. Fünfzehn TK waren sensibel gegenüber Imipenem. Die TK des *E. coli*- Isolats IHIT22064, die neben dem OXA-48-Plasmid auch das TEM-1-Plasmid aufgenommen hat, wies zudem eine Resistenz gegenüber Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol auf (Tabelle 33).

**Tabelle 33: Übersicht über alle vorhandenen OXA-48-TK und deren Resistenzen**

Nr. TK	IHIT-Nr. Wildtyp	Spezies Wildtyp	ST Wildtyp	übertragene Resistenzen <sup>1</sup>
TK1	22059	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT
TK2	22061	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFT
TK3	22063	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT
TK4	22065	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, IMI
TK5	22721	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT
TK6	22066	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, IMI
TK7	22715	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	AMP, AMC, PIP
TK8	22716	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, IMI
TK9	22717	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	AMP, AMC, PIP, CFX
TK10	23256	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT
TK11	23257	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	AMP, AMC, PIP, CFX, <b>CFT</b>
TK12	24171	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, IMI
TK13	24177	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX
TK14	25327	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	AMP, AMC, PIP, CFX
TK15	25328	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT
TK16	25329	<i>K. oxytoca</i>	nt	AMP, AMC, PIP, CFX, IMI
TK17	22060	<i>E. coli</i>	ST1196	AMP, AMC, PIP, CFX, CFT, IMI
TK18	22062	<i>E. coli</i>	ST1196	AMP, AMC, PIP, TET, SXT
TK19	22064	<i>E. coli</i>	ST1431	AMP, AMC, PIP, CFX, CFD, CFT, IMI
TK20	22714	<i>E. coli</i>	ST1196	AMP, AMC, PIP, <b>CFX</b>
TK21	22718	<i>E. coli</i>	ST410	AMP, AMC, PIP, CFX

1= ermittelt mittels VITEK-2-System (Auswertung erfolgt wie unter 2.1.5.2 beschrieben)

AMP= Ampicillin, AMC= Amoxicillin-Clavulansäure, PIP= Piperacillin, CFX= Cefalexin, CFD= Cefpodoxim, CFT= Ceftiofur, IMI= Imipenem, TET= Tetracyclin, SXT= Trimethoprim/Sulfamethoxazol

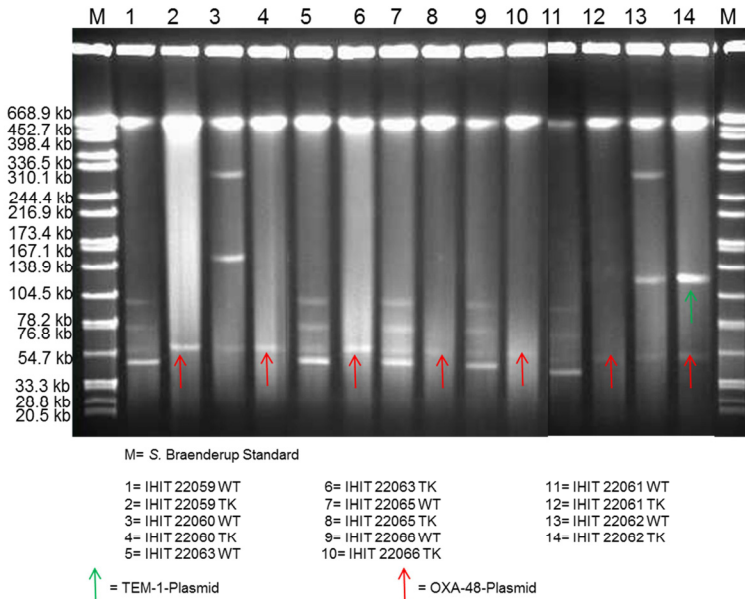
**in fetter Schrift:** Resistenz, die nur bei der TK, nicht jedoch beim Wildtyp auftrat.

nt: nicht typisiert

### 3.4.3 S1-Nuclease-Verdau zur Größenbestimmung des OXA-48-Plasmids

In Abbildung 17 sind beispielhaft sieben OXA-48-positive WT-Isolate und deren TK nach einem S1-Nuclease-Verdau mit anschließender PFGE dargestellt.





**Abbildung 17: S1-Nuclease-Verdau von sieben OXA-48-positiven WT und deren TK**  
Bild: Dr. Yvonne Pfeifer, RKI Wernigerode

Es wird deutlich, dass alle WT als auch die TK ein ca. 60 kb großes Plasmid, das mittels PCR als OXA-48-Plasmid identifiziert werden konnte, besaßen. Dieses ca. 60 kb große Plasmid fand sich auch bei allen anderen hier nicht dargestellten OXA-48-positiven WT und (wenn vorhanden) deren TK wieder. Das TEM-1-Plasmid, das im Fall der Isolate IHIT22062 und IHIT22064 ebenfalls von dem Rezipientenstamm aufgenommen wurde, zeigte eine Größe von ca. 130 kb.

### 3.4.4 Bestimmung des Replikon-Typs und Nachweis konservierter Genregionen auf dem OXA-48-Plasmid

Die TK, die nur das OXA-48-Plasmid aufgenommen hatten, wurden zur Bestimmung des Plasmid-Replikontyps mit dem PBRT-Kit (2.3.5.5) untersucht. Es konnte hier allerdings keine Zuordnung zu einem bestimmten Replikon-Typ erfolgen, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen die IncL/M-Gruppe noch nicht in dem Kit enthalten war. Es wurden jedoch bei allen TK die auf dem OXA-48-Plasmid liegenden konservierten Gene *repA*, *parU* und *traT* mittels PCR nachgewiesen. In späteren Untersuchungen mit dem geeigneten PBRT-Kit, in das zwischenzeitlich die IncL/M-Gruppe integriert wurde, konnte eine eindeutige Zuordnung zu der IncL-Gruppe gezeit werden.

### 3.4.5 Generierung plasmidfreier Varianten von OXA-48-bildenden *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämmen

Um von den OXA-48-bildenden *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämmen OXA-48-Plasmid-freie Varianten (plasmid cured variant = PCV) zu generieren, wurden diese unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Dazu wurde stellvertretend je ein Isolat jedes *K. pneumoniae*-PFGE-Typs und je ein *E. coli* pro ST ausgewählt und der Behandlung mit Acridinorange bzw. einer wiederholten Inkubation bei 43°C unterzogen. Bei zwei *K. pneumoniae*-Isolaten des ST15 (PFGE-Typ D und F) und bei allen *E. coli*-Isolaten gelang die Erstellung einer PCV. Bei den übrigen *K. pneumoniae*-Isolaten gelang es auch nach 30 Subkultivierungen nicht, eine plasmidfreie Variante des WT zu generieren.

Auf diese Weise konnten 5 „Trios“ (WT-TK-PCV, Tabelle 34) geschaffen werden, die die Grundlage für die Durchführung des Kristallviolett-Mikrotiterplattentests (KV-MTP-Test) bildeten und die auch mittels Spanagar auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht wurden (s. 3.5.2).

**Tabelle 34: Übersicht über die Isolate, von denen Transkonjugante und Plasmid-cured variants (PCV) generiert werden konnten**

IHIT-Nr.	Spezies	Sequenztyp (PFGE-Typ)	Plasmidverlust bei Passage
IHIT22059	<i>K. pneumoniae</i>	ST15 (Kp-D)	13
IHIT24177	<i>K. pneumoniae</i>	ST15 (Kp-F)	14
IHIT22714	<i>E. coli</i>	ST1196 (Ec-A)	6
IHIT22718	<i>E. coli</i>	ST410 (Ec-C)	8
IHIT22064	<i>E. coli</i>	ST1431 (Ec-B)	9

## 3.5 Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Fähigkeit der Biofilmbildung

### 3.5.1 Kristallviolett-Mikrotiterplattentest (KV-MTP-Test)

In dem KV-MTP-Test wurden die in Tabelle 34 aufgelisteten Stämme und deren zugehörige TK und PCV auf ihre Fähigkeit der Biofilmbildung untersucht. Alle Stämme wurden bei der Durchführung des Versuchs sowohl in LB- als auch in M63-Medium in 6-facher Ausführung eingesetzt. Einige Stämme zeigten eine so starke Biofilmbildung, dass die Messung der OD<sub>570</sub> nach KV-Färbung Werte oberhalb des Cutoff-Wertes 4 ergaben und eine genauere Messung nicht möglich war. In diesem Fall ergab sich die Meldung „Überlauf“. Um die Messungen dennoch in die Auswertungen einbeziehen zu können, wurde die OD<sub>570</sub> in diesen Fällen gleich 4 gesetzt.

### 3.5.1.1 Ergebnisse der Biofilmbildung im LB-Medium

Der Wert der spezifischen Biofilmbildung (SBF = specific biofilm formation) wurde mit der unter 2.4.1 genannten Formel errechnet. Es wurden jeweils der Vergleich zwischen WT und der PCV und der Vergleich zwischen TK und dem *E. coli* J53 statistisch ausgewertet.

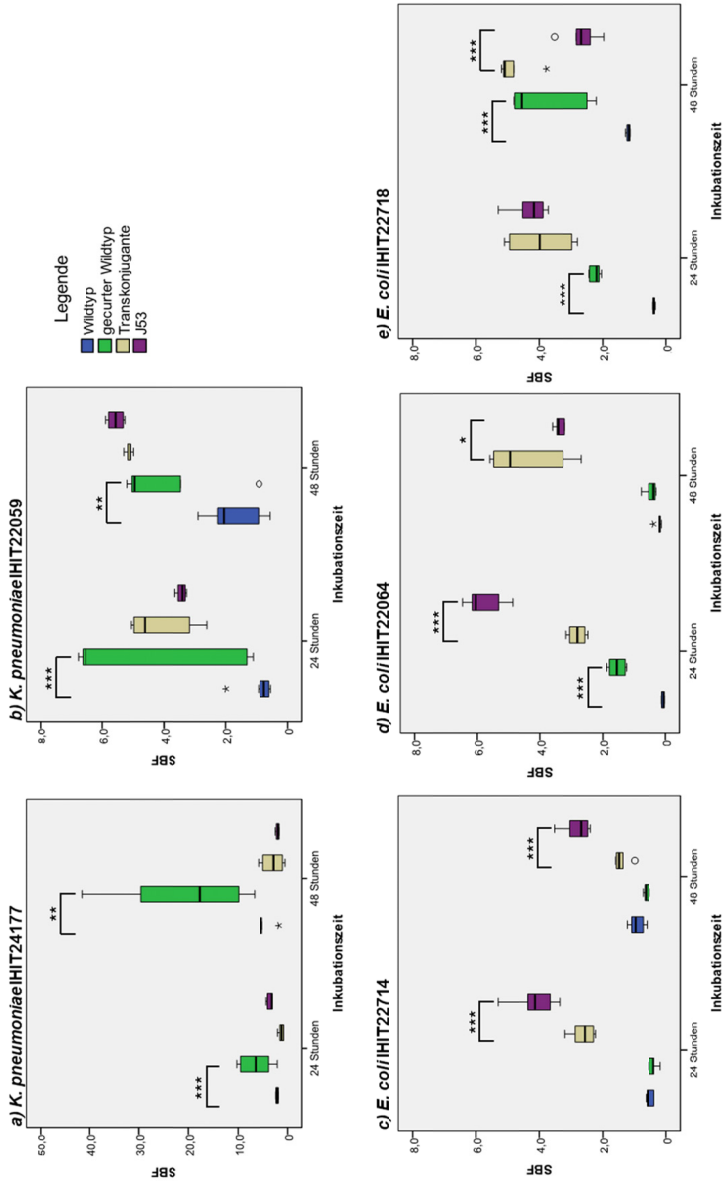
Nach 24 h ergab sich so außer für das *E. coli*-Isolat IHIT22714 eine hochsignifikante Erhöhung der Biofilmbildung der PCV im Vergleich zum WT. Darüber hinaus konnte für die *E. coli*-Isolate IHIT22714 und IHIT22064 eine hochsignifikante Erniedrigung der SBF bei der TK im Vergleich zum *E. coli* J53 beobachtet werden.

Nach 48 h konnte eine hochsignifikante Erhöhung der SBF des gecurten WT im Vergleich zum WT bei dem *E. coli*-Isolat IHIT22718 und eine signifikante Erhöhung bei den *K. pneumoniae*-Isolaten IHIT24177 und IHIT22059 beobachtet werden. Zudem ergab sich eine hochsignifikante Erniedrigung der SBF der TK von *E. coli* IHIT22714 im Vergleich zum *E. coli* J53. Dem gegenüber stand eine hochsignifikante Erhöhung der SBF der TK von *E. coli* IHIT22718 im Vergleich zum *E. coli* J53.

### 3.5.1.2 Ergebnisse der Biofilmbildung im M63-Medium

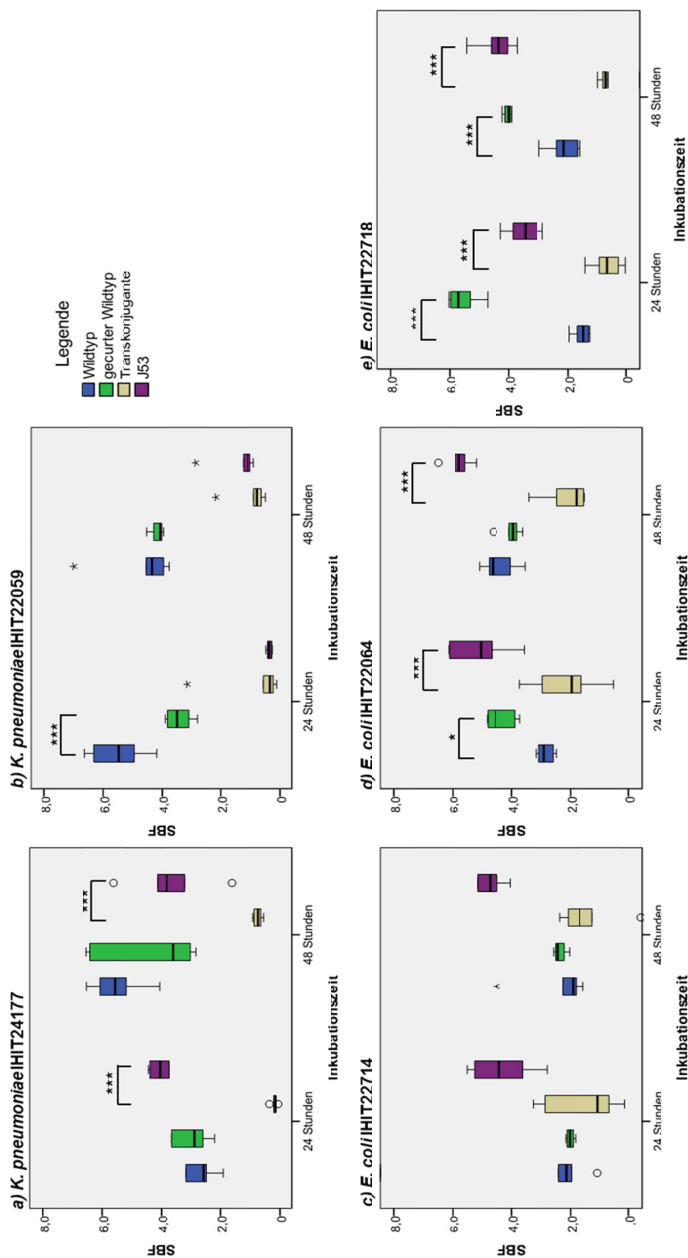
Für die Isolate *K. pneumoniae* IHIT24177, *E. coli* IHIT22718 und *E. coli* IHIT22064 ergab sich sowohl für die Inkubationszeit von 24 h als auch von 48 h eine hochsignifikante Erniedrigung der SBF der jeweiligen TK im Vergleich zum *E. coli* J53. Für das Isolat *E. coli* IHIT22718 konnte zudem bei einer Inkubationszeit von 24 h und von 48 h eine hochsignifikante Erhöhung der SBF der PCV im Vergleich zum WT beobachtet werden. Bei dem Isolat *K. pneumoniae* IHIT22059 hingegen war die SBF des WT gegenüber der PCV nach 24 h Inkubationszeit hochsignifikant erhöht.

Zur besseren Darstellbarkeit wurde bei IHIT22714 (WT, 24h) und bei IHIT22718 (TK, 48h) jeweils ein Ausreißer aus der Abbildungen 19 entfernt. Zur Berechnung der Signifikanzen und der Boxplots wurden diese allerdings berücksichtigt.



Abbildungen 18 a-e: Boxplots für die spezifische Biofilmbildung (SBF) von OXA-48-Plasmid-tragenden Wildtypen, Plasmid-gecurten Varianten, Transkonjuganten und des *E. coli* J53 im LB-Medium bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Erläuterung: \*\*\*;  $p \leq 0,001$ ; \*\*;  $p \leq 0,01$ ; \*;  $p \leq 0,05$



Abbildungen 19 a-e: Boxplots für die spezifische Biofilmbildung (SBF) von OXA-48-Plasmid-tragenden Wildtypen, Plasmid-gecurten Varianten, Transkonjuganten und des *E. coli* J53 im M63-Medium bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Erläuterung: \*\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*:  $p \leq 0,05$

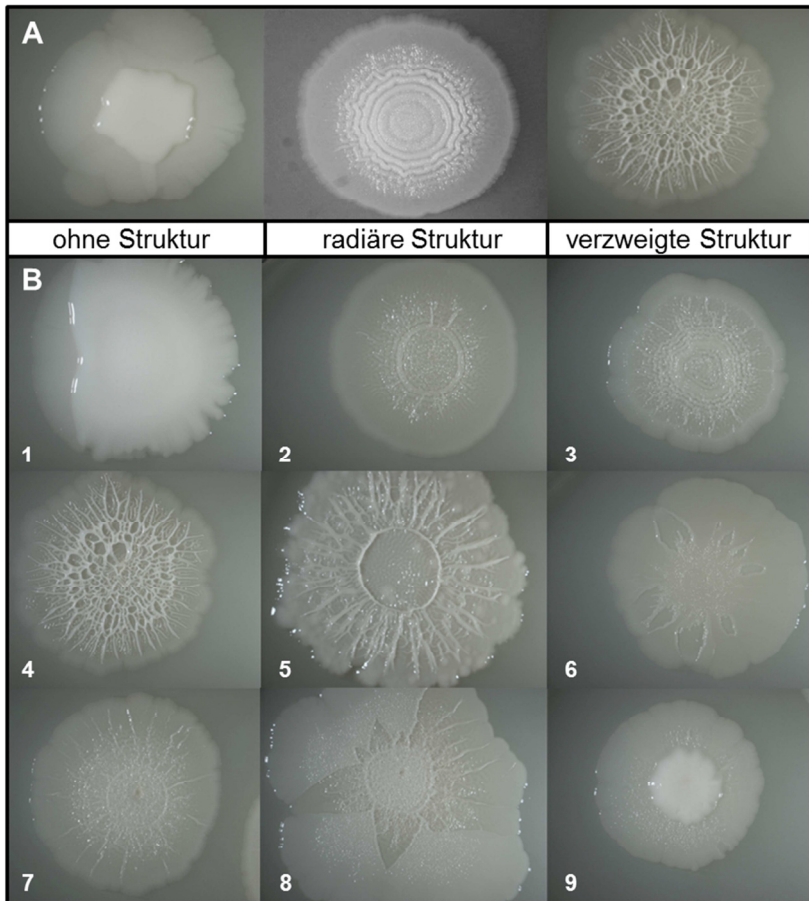
### 3.5.2 Langzeitkolonien auf Spanagar zur Bestimmung der Fähigkeit zur Biofilmbildung

Für diesen Versuch wurde je ein OXA-48-produzierendes *K. pneumoniae*-Isolat mit der zugehörigen TK stellvertretend aus fünf der sechs verschiedenen PFGE-Gruppen und deren Subgruppen ausgewählt (Tabelle 33). Von dem ST895-Isolat, das allein die Gruppe B bildete, konnte keine TK hergestellt werden. Dieses Isolat wurde in den folgenden Untersuchungen daher nicht berücksichtigt. Zudem wurde der Versuch mit allen fünf OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolaten und mit dem *K. oxytoca*-Isolat plus deren TK durchgeführt. Wenn vorhanden, wurden auch die PCV mit einbezogen, um eventuelle Unterschiede in der Biofilmbildung der einzelnen Varianten und damit den Einfluss des OXA-48-Plasmids näher bestimmen zu können. Neben Positiv- und Negativkontrollen wurde auch der *E. coli* J53 mitgeführt, um eine eventuell schon bestehende Fähigkeit der Biofilmbildung bei diesem Stamm berücksichtigen zu können. Er bildete bei 28°C sowohl bei den Platten mit und ohne NaCl-Zusatz wenige, schwach verzweigte Oberflächenstrukturen (Abbildung 20).

Alle *Klebsiella* spp.-WT-Isolate zeigten sowohl bei 37°C als auch bei 28°C keine Biofilmbildung (Tabelle 35, Abbildung 20). Die dazugehörigen TK bildeten bei 28°C auf den Spanagarplatten mit NaCl-Zusatz in allen Fällen einen deutlichen Biofilm. Bei 37°C zeigten auch die TK keine auf eine Biofilmbildung hindeutende Oberflächenstruktur (Tabelle 35, Abbildung 20). Die von Isolat IHIT22059 und IHIT24177 generierten PCV zeigten sowohl bei 28°C als auch bei 37°C keine radiären oder verzweigten Oberflächenstrukturen.

Anders verhielt es sich bei den OXA-48-bildenden *E. coli*-WT. Bei allen Isolaten konnte bei 28°C sowohl auf den Platten mit NaCl-Zusatz als auch auf den Platten ohne NaCl-Zusatz eine deutliche Biofilmbildung beobachtet werden (Abbildung 20). Isolat IHIT22064 zeigte dieses Verhalten auch bei den bei 37°C inkubierten Platten ohne NaCl-Zusatz (Tabelle 35, Abbildung 20). Die TK von Isolat IHIT22060 und IHIT22062 zeigten weder bei 28°C noch bei 37°C Oberflächenstrukturen, die TK der Isolate IHIT 22064 und IHIT22714 hingegen zeigten eine schwache Ausprägung der radiären Verzweigung bei beiden bei 28°C inkubierten Platten, die vergleichbar mit der des *E. coli* J53 war (Abbildung 20). Die TK des Isolats IHIT22718 hingegen zeigte bei 28°C eine ausgeprägte radiäre Oberflächenstruktur auf beiden Plattenvarianten (Tabelle 35, Abbildung 20). Die von den Isolaten IHIT22714 und IHIT22064 generierten PCV zeigten keine Oberflächenstrukturen, wohingegen die PCV des Isolats IHIT22718 bei 28°C eine deutlich verzweigte Struktur aufwies (Abbildung 21).

Eine erneute Durchführung des Versuchs an einem anderen Tag erbrachte die gleichen Ergebnisse.



**Abbildung 20: Darstellung der Wachstumsformen auf Spanagar (A) und Übersicht über die Formen des Wachstums eigener Isolate auf Spanagar (Auswahl)**

1= IHIT22059 WT, -/+NaCl, 28°C/37°C

2= IHIT22059 TK, -NaCl, 28°C

3= IHIT22059 TK, +NaCl, 28°C

4= IHIT22060 WT, -/+ NaCl, 28°C

6= IHIT22714 TK, -/+ NaCl, 28°C

7= IHIT22718 TK, -/+NaCl, 28°C

8= IHIT22718 PCV, -/+NaCl, 28°C

9= *E. coli* J53, -/+NaCl, 28°C

Tabelle 35: Übersicht über die Biofilmbildung der verschiedenen Varianten OXA-48-bildender *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate (WT, TK, PCV) auf Spanagar

IHIT-Nr.	Spezies- PFGE-Typ (ST)	WT				TK				PCV			
		28°C		37°C		28°C		37°C		28°C		37°C	
		+NaCl	-NaCl	+NaCl	-NaCl	+NaCl	-NaCl	+NaCl	-NaCl	+NaCl	-NaCl	+NaCl	-NaCl
22060	Ec-A (ST1196)	+	+	-	-	-	-	-	-	nv	nv	nv	nv
22062	Ec-A (ST1196)	+	+	-	-	-	-	-	-	nv	nv	nv	nv
22064	Ec-B (ST1431)	+	+	-	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
22714	Ec-A (ST1196)	+	+	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
22718	Ec-C (ST410)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
22059	Kp-D1 (ST15)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-
22715	Kp-C2 (ST11)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
25329	Kox-nt (ST145)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
22717	Kp-C1 (ST11)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
23256	Kp-F2 (ST11)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
24171	Kp-E (ST15)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
23257	Kp-A (ST11)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
24177	Kp-F1 (ST15)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv
25328	Kp-F2 (ST15)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	nv	nv	nv	nv

Erläuterung: += Biofilmbildung; -= keine Biofilmbildung; (+)= Biofilmbildung schwach, vergleichbar mit der des *E. coli* J53; nv= nicht vorhanden



## V Diskussion

### 1. Aufbau der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über die Verbreitung ESBL- und Carbapenemase-produzierender *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate und die Verteilung beteiligter Enzymtypen innerhalb des zur mikrobiologischen Untersuchung in das diagnostische Labor des IHIT der JLU Gießen eingeschickten Probenmaterials von Tieren zu erhalten. Gleichzeitig sollten durch Untersuchungen auf zusätzliche Resistenzmechanismen gegenüber anderen Antibiotikaklassen Isolate mit Multiresistenz erkannt, näher typisiert und durch Verwandtschaftsanalysen in einen epidemiologischen Kontext gesetzt werden. Zusätzlich sollte bei ESBL-bildenden *E. coli* die Zugehörigkeit zu bestimmten Pathotypen bestimmt werden.

Hierfür wurden in einem Zeitraum von 12 aufeinanderfolgenden Monaten alle aus dem eingesandten Untersuchungsgut kultivierten *E. coli*-Isolate einem Screening auf eine ESBL-/Carbapenemase-Produktion unterzogen. Durch die gewählte Zeitspanne und vor dem Hintergrund des durchschnittlichen Probenaufkommens in der diagnostischen Abteilung des Instituts sollte eine repräsentative Anzahl an Isolaten sichergestellt und ein möglicher saisonaler Einfluss, der z. B. durch das vermehrte Vorkommen von zuchthygienischen Untersuchungen von Pferden im Frühjahr und Herbst zustande kommen könnte, auf die Heterogenität des Probenmaterials minimiert werden. Aufgrund der insgesamt gegenüber *E. coli* niedrigeren Nachweisrate von *Klebsiella* spp.-Isolaten aus klinischem Untersuchungsgut wurden diese über einen Zeitraum von 18 Monaten gesammelt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die relative Häufigkeit des Vorkommens von ESBL-/Carbapenemase-Bildnern erhoben. Einsender des Untersuchungsmaterials waren ca. 400 Tierarztpraxen und -kliniken aus ganz Deutschland inklusive der Veterinärkliniken und der Veterinärpathologie des Fachbereichs 10 der JLU Gießen. Aufgrund lückenhafter Vorberichte war es nicht möglich, jegliches Probenmaterial einer bestimmten Altersgruppe oder im Falle von LM-liefernden Tieren einer bestimmten Nutzungsrichtung zuzuordnen. Auch der Krankheitsstatus (akut oder chronisch erkrankt) oder eine eventuelle Vorbehandlung mit antimikrobiellen Substanzen war nicht immer bekannt. Das eingesandte Probenmaterial stammte laut Vorberichten größtenteils von kranken, und nur zu einem geringeren Teil von gesunden Tieren, wie z. B. im Falle von zuchthygienischen Untersuchungen insbesondere bei Pferden. Diese Arbeit hebt sich also in Bezug auf das Probenmaterial von anderen Studien, in denen meist gesunde LM-liefernde Tiere mittels Untersuchungen von Kotproben auf das Vorhandensein von ESBL-/Carbapenemase-Bildnern gescreent werden, ab. Da eine Zuordnung jedoch nicht immer möglich war, wurde in der gesamten Arbeit auf eine Unterteilung in kranke und gesunde Tiere verzichtet.

Mit Ausnahme der Wahl des Zeitraums wurde keine weitere Vorselektion des Probenmaterials vorgenommen. Es gingen alle Isolate unabhängig von ihrer klinischen Herkunft oder der Tierart, von der sie isoliert wurden, mit in die Untersuchungen ein. So lässt sich die ungleiche Verteilung der in die Arbeit eingeflossenen Isolate in Bezug auf Tierarten und klinisches Probenmaterial erklären.

## **2. ESBL-/AmpC-bildende *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate**

### **2.1 Relatives Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* und *Klebsiella* spp.-Isolate**

Wie viele ESBL-Bildner innerhalb einer Studie nachgewiesen werden, hängt stark von der Auswahl der Screeningmethodik ab. Der Selektivagar für das Initialscreening auf ESBL wurde in Anlehnung an eine andere Studie gewählt [249] und orientiert sich an den Vorgaben der CLSI [235]. Auf dem Selektivagar wuchsen 438 *E. coli*- und 69 *Klebsiella* spp.-Isolate. Im phänotypischen Bestätigungstest konnten davon 280 *E. coli*- und 49 *Klebsiella* spp.-Isolate als ESBL-Bildner bestätigt werden, hinzu kamen 38 bzw. 11 AmpC-verdächtige Isolate. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des Initialscreenings und des Bestätigungstests lässt sich mit der niedrigen Spezifität des Selektivmediums erklären. Aufgrund der geringen Cephalosporinkonzentration (1 mg/L) ist es manchen Isolaten möglich, ein Wachstum zu zeigen, obwohl sie keine ESBL- und/oder AmpC, sondern eventuell einen anderen Resistenzmechanismus (wie z. B. verminderte Produktion von Porinen oder erhöhte Anzahl von Efflux-Pumpen) gegenüber dem eingesetzten Cephalosporin besitzen [249]. Die Sensitivität der Screeningmethode, das heißt, die Wahrscheinlichkeit, einen ESBL-/AmpC-Bildner als falsch negativ zu werten, ist dadurch geringer. In der Studie von Wilson *et al.* (2007) wuchsen bei 630 untersuchten klinischen Proben 81 Enterobacteriaceae-Isolate auf dem Selektivagar. Von diesen 81 Isolaten konnten letztendlich 12 mittels Bestätigungstest als ESBL-Bildner identifiziert werden [249]. Das ergibt eine höhere Diskrepanz als in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte, allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei Wilson *et al.* neben *E. coli* und *Klebsiella* spp. auch andere Vertreter der Enterobacteriaceae wie z. B. *Proteus mirabilis* oder *S. liquefaciens*, die häufig andere Resistenzmechanismen als  $\beta$ -Laktamasen aufweisen, in die Untersuchungen mit einbezogen wurden [249].

### **E. coli**

Der Anteil von ESBL- und/oder AmpC-bildenden *E. coli*-Isolaten innerhalb des Untersuchungszeitraums gemessen an der Gesamtisolatanzahl lag bei 8,9 % (318/3582). Prozentual am meisten ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* konnten bei Rindern (17,3 %; 59/340) und bei Hunden (12,5 %; 73/583) gefunden werden. Bei Katzen, Pferden und Schweinen lag die relative Häufigkeit jeweils zwischen 7 % (16/218) und 9 % (44/496). In einer portugiesischen Studie, in der von 2009-2013 598 *E. coli*-Isolate von LM-liefernden Tieren sowie von Hobby- und Zootieren einer Empfindlichkeitsprüfung unterzogen wurden, erwiesen sich 4,5 % der Isolate als resistent gegenüber Cefotaxim, was zwar eine der Indikatorsubstanzen für ESBL darstellt, jedoch nicht mit dem Vorhandensein einer ESBL gleichzusetzen ist. Die Isolate stammten dabei sowohl aus klinischen Proben als auch aus Screeningproben. Die Resistenzrate lag bei Hobbytieren höher (10,6 %; 12/113) als bei LM-liefernden Tieren (3,7 %; 8/215). Bei Zootieren lag sie bei 2,6 % (7/270). In 23 Fällen konnte ein ESBL-/AmpC-Gen nachgewiesen werden [250]. In der genannten Studie wurden für die Auswertungen der Empfindlichkeitsprüfungen epidemiologische Cut-Off-Werte nach EUCAST verwendet. Dieser liegt für Cefotaxim bei 0,25 mg/L (<http://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?id=3217>). Der klinische Grenzwert nach CLSI liegt bei > 4 mg/L [236]. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse nicht unmittelbar miteinander vergleichbar und die Häufigkeiten können voneinander abweichen. Zudem wurde in oben genannter Studie kein Bestätigungstest für ESBL-/AmpC-Bildner durchgeführt.

Die meisten Studien, die sich mit Prävalenzen und relativen Häufigkeiten von ESBL- und AmpC-Bildnern bei Tieren befassen, legen ihren Fokus auf eine Tierart oder eine bestimmte Gruppe von Tieren. Obwohl bekannt ist, dass auch Hobbytiere einen Ursprung für eine Infektion mit ESBL-/AmpC-Bildnern beim Menschen darstellen können, existieren hier im Vergleich zu LM-liefernden Tieren, deren Bedeutung hinsichtlich Verbraucherschutz und öffentlichem Interesse derzeit eindeutig überwiegt, deutlich weniger Studien [4, 251]. Bei den Studien zum Vorkommen von ESBL-bildenden Bakterien bei LM-liefernden Tieren handelt es sich jedoch oftmals um Häufigkeitsangaben auf Betriebs- und nicht auf Einzeltierebene. Ein Vergleich verschiedener Studien untereinander und auch mit dieser Arbeit kann aufgrund der bereits genannten Aspekte wie Unterschiede in Studiendesign, Auswahl der Screeningmethode und Probenanzahl nur unter Vorbehalt bzw. sehr differenziert erfolgen. Deutlich wird dennoch, dass ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* im Nutztierbereich in hohem Maß vertreten sind. So konnten García-Cobos *et al.* bei einer Studie aus dem Jahr 2015 in 18,8 % von 564 untersuchten Kot- und Staubproben aus 47 verschiedenen Schweinebetrieben in Nordwest-Deutschland ESBL-bildende *E. coli* nachweisen [79]. Friese *et al.* wiesen zudem in 56,3 %

der untersuchten Schweineaufzuchtbetriebe und in 43,8 % der Schweinemastbetriebe ESBL-bildende *E. coli* nach [252]. Im Rahmen eines nationalen Monitoringprogrammes im Vereinigten Königreich konnten bei 23,4 % der 637 gescreenten Kotproben ESBL-bildende *E. coli* gefunden werden [253]. Eine Zusammenfassung ausgewählter Studien aus dem Zeitraum 2003-2013, die sich mit Prävalenzen von ESBL-Bildnern bei Nutztieren befassten, zeigt eine deutliche Heterogenität der Ergebnisse der einzelnen Studien. Bei Schweinen lagen die Betriebsprävalenzen zwischen 1 % und 80 % und die Einzeltierprävalenzen bei 15 % bis 100 %. Sie unterschieden sich z. T. deutlich in den jeweiligen Arten der Betriebe [254]. Mit einem relativen Vorkommen von 9,6 % (105/1092) liegt die Häufigkeit von ESBL-bildenden *E. coli* aus dem Kot von Schweinen in der vorliegenden Arbeit im unteren Bereich. Gründe dafür könnten zum einen die nicht durchgeführte Anreicherung des Probenmaterials in Selektivnährmedien (z. B. MacConkey-Bouillon mit 8 mg/L Cefotaxim) sein, die möglicherweise in vielen Studien zu einem vermehrten Nachweis von ESBL-Bildnern geführt hat [254]. Die Anreicherung von Probenmaterial in Selektivnährmedien stellt keine vorgeschriebene Standardmethode zum Nachweis von ESBL-/AmpC-Bildnern dar. Es wäre denkbar, dass erst innerhalb des Nährmediums, in denen die im Probenmaterial vorhandenen Bakterien mit der antibiotischen Substanz in Kontakt kommen, ein Austausch von ESBL-/AmpC-Plasmiden erfolgt, so dass initial negative Isolate möglicherweise anschließend ESBL-/AmpC-positiv getestet werden und die Nachweisrate steigt. Andererseits können durch die fehlende Anreicherung ESBL-/AmpC-Bildner, die nur in einem geringen Maß im Probenmaterial enthalten sind, von Begleitkeimen überwuchert und somit dem Nachweis entzogen werden, was zu einer niedrigeren Nachweisrate führen könnte. Ein weiterer Aspekt, der zu einem geringeren Anteil von ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* in dieser Arbeit geführt haben könnte, ist, dass nicht das gesamte Probenmaterial auf einem Selektivagar ausgestrichen wurde, sondern nur die bereits kultivierten Isolate. So ist es möglich, dass ESBL-Bildner, die sich in dem Ausgangsprobenmaterial befanden, nicht als solche identifiziert wurden. Wie groß dieser Anteil ist, kann jedoch nicht beziffert werden. Zum anderen kann die relative Häufigkeit durch das Einbeziehen von Problembetrieben, das dortige Beprobieren mehrerer Tiere und somit auch die Gewinnung eventuell identischer Isolate, erhöht werden. Um einen solchen Bias in dieser Arbeit zu vermeiden, wurden identische Isolate aus einem Herkunftsbetrieb mittels PFGE ermittelt und „copy“-Isolate von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Mit 22,9 % (40/176) liegt der Anteil an ESBL-bildenden *E. coli* aus Kotproben von Rindern in dieser Arbeit im mittleren Bereich im Vergleich mit den von Hille *et al.* ausgewerteten europäischen Studien aus den Jahren 2003-2013. Hier lagen die Betriebsprävalenzen zwischen 4 % und 87 %, die von Einzeltieren zwischen 0 % und 100 % [254]. Es ist jedoch die stark variierende Anzahl an beprobten Tieren zu beachten, die einen Vergleich nur unter Vorbehalt

zulässt. In einer aktuellen Studie aus Israel, in der Kotproben von 1226 Rindern aus 40 Betrieben untersucht wurden, waren 23,4 % der Proben positiv für ESBL-/AmpC-bildende *E. coli*. Ältere Rinder (> 25 Monate) waren am wenigsten betroffen, Kälber (< 4 Monate) zeigten die höchste Rate an positiven Isolaten [255]. In einer niederländischen Studie wurden 1000 Kotproben von Mastkälbern aus 100 Betrieben kurz nach der Schlachtung auf ESBL-/AmpC-Bildner untersucht. 66 % der Betriebe erwiesen sich als positiv, wobei der Anteil positiver Tiere innerhalb der Betriebe zwischen 0 % und 100 % lag [256].

Die Prävalenzen, die sich aus verschiedenen standardisierten europäischen Monitoringprogrammen ergaben, lagen sowohl für Schweine als auch für Rinder deutlich unter denen in den o.g. Studien erhobenen Daten und auch unter den in dieser Arbeit ermittelten relativen Häufigkeiten. Die von der EFSA durchgeführte Auswertung der Monitoringprogramme von 9 bzw. 10 Mitgliedsstaaten zur Überwachung von Zoonoseerregern im Jahr 2013 ergab eine durchschnittliche Häufigkeit für Cefotaxim-resistente *E. coli*-Isolate von 1,2 % bei Rindern und 1,3 % bei Schweinen [257]. Cefotaxim gilt zwar als eine der Indikatorsubstanzen für den Nachweis einer ESBL, allein das Wachstum von Isolaten auf Cefotaxim-haltigen Medien beweist jedoch nicht, dass tatsächlich ein ESBL-Enzym vorhanden ist. Somit ist ein direkter Vergleich mit dieser Arbeit, in der ESBL-Bildner auch wirklich als solche identifiziert wurden, nicht möglich. Die in den von der EFSA ausgewerteten Monitoringprogrammen berücksichtigten Isolate stammten zudem von gesunden Tieren und wurden mit epidemiologischen Grenzwerten (Cut-Off-Wert für Cefotaxim 0,25 mg/L) beurteilt. In den o.g. Prävalenz- und Häufigkeitsstudien und auch in dieser Arbeit wurden hingegen klinische Grenzwerte (für Cefotaxim: S ≤ 1 mg/L, I: 2-4 mg/L, R: ≥ 4 mg/L) verwendet, da zumindest in dieser Studie diagnostisches Probenmaterial untersucht wurde und somit Therapieoptionen berücksichtigt werden mussten. Außerdem ist die hohe Anzahl an getesteten Isolaten (Schweine: n=1239, Rinder n=2294), die von Tieren aus vielen verschiedenen Betrieben stammten, zu beachten. In den o.g. Nicht-Monitoringstudien wurden häufig mehrere positive Tiere aus einem Betrieb mit in die Untersuchungen einbezogen, so dass ESBL-/AmpC-positive Betriebe die Prävalenzen erhöhen können.

In dem GERMAP-Bericht, herausgegeben vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., wird die Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen ausschließlich bei erkrankten Tieren erfasst. Die Daten stammten überwiegend aus dem nationalen Resistenzmonitoring tierpathogener Bakterien (GERM-Vet) des BVL. Es konnte ein vermehrtes Auftreten von ESBL-bildenden *E. coli* bei an Enteritis erkrankten Kälbern in den letzten Jahren beobachtet werden (2009: 18 %, 2011: 25 %, 2013: 29 %). Die Bewertung dieser Daten sollte allerdings vor dem Hintergrund der z. T. geringen Probenzahl vorsichtig erfolgen (160/2009, 173/2011, 250/2013) [157, 258].

In verschiedenen Studien wurde bereits das Vorkommen von ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* sowohl bei gesunden als auch bei kranken Hobbytieren wie Hunden, Pferden und Katzen beschrieben [204, 259-261]. Es ist jedoch schwierig, Angaben zu Prävalenzen oder relativen Häufigkeiten innerhalb dieser Populationen zu machen, da Monitoringprogramme, wie sie im Nutztierbereich bereits in zahlreichen Ländern etabliert sind, zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht existierten. Die bisher durchgeführten Studien unterscheiden sich stark in ihrem Design und der Anzahl der untersuchten Proben. Die Praktikabilität der Probenentnahme, die im Bereich der LM-liefernden Tiere aufgrund der Bestandsgrößen und der Möglichkeit, auf dem Schlachthof am getöteten Tier Proben zu nehmen, deutlich besser ist als im Hobbytierbereich, erklärt den meist geringen Probenumfang bei Hobbytieren. Zudem existieren laut Statistischem Bundesamt deutlich mehr LM-liefernde Tiere in Deutschland (Rinder 12,6 Mio., Schweine 27,1 Mio.; <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TiereundtierischeErzeugung/TiereundtierischeErzeugung.html>; letzter Zugriff Oktober 2016) als Hobbytiere (Schätzung des Industrieverbands Heimtierbedarf 2014: Hunde 6,8 Mio., Katzen 11,8 Mio.; <http://www.ivh-online.de/de/der-verband/daten-fakten/archiv.html>; letzter Zugriff Oktober 2016). In einigen Fällen wurde, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, eine gewisse Anzahl an Isolaten, die von diagnostischen Laboren zur Verfügung gestellt wurde, untersucht, wodurch jedoch keine Prävalenzen dargestellt werden können [112, 262].

In einer portugiesischen Studie von Belas *et al.*, in der 131 *E. coli*-Isolate aus 151 Rektumtupfern von gesunden Hunden isoliert wurden, erwiesen sich 15 % als ESBL- und 20 % als AmpC-Bildner [263]. Diese Angaben liegen deutlich über den Werten, die in dieser Arbeit ermittelt werden konnten (Hunde: 8,6 % ESBL-, 3,8 % AmpC-Bildner). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die von Belas *et al.* durchgeführte Anreicherung des Probenmaterials über Nacht in Peptonwasser. Ein deutlich höheres Vorkommen konnten zudem in den Niederlanden Hordijk *et al.* in ihrer Studie, in der jeweils 20 Kotproben von gesunden und von an Diarrhoe leidenden Hunden und Katzen auf ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* untersucht wurden, ermitteln. Hier erwiesen sich 45 % der gesunden und 55 % der kranken Hunde als Träger von ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*. Bei den Katzen waren es 0 % respektive 25 %. Zu beachten ist jedoch hier die geringe Probenanzahl in jeder Gruppe [261]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sun *et al.*, die 240 Proben von gesunden (n=106) und kranken (n=134) Hunden und Katzen aus China untersuchten und eine signifikant höhere Rate an ESBL-bildenden *E. coli* bei den kranken Tieren finden konnten (54,5 % versus 24,5 %) [72]. In den übrigen zu diesem Thema durchgeführten Studien lag das relative Vorkommen von ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* zwischen 3,1 und 20 % [4].

Die wenigen Resistenz-Monitoringprogramme, in denen Hobbytiere bisher Berücksichtigung gefunden haben, können aufgrund der dort oftmals nur geringen Probenanzahl, dem unter-

einander nicht-standardisierten Untersuchungsverfahren und in manchen Fällen der Beschränkung auf die Ermittlung von MHK-Werten von ausgewählten Cephalosporinen nicht als Referenz dienen [16, 157, 258, 264]. Aufgrund des immer engeren Kontakts zwischen den Hobbytieren und ihren Besitzern und der Gefahr der Übertragbarkeit von Resistenzgenen bzw. resistenten Bakterien auf den Menschen wäre ein verbessertes Monitoring dringend erforderlich. Diese Arbeit unterstützt durch den Nachweis einer relativ hohen Anzahl von ESBL-/AmpC-Bildnern bei Hobbytieren und zusätzlich durch den Nachweis von Genotypen, die beim Menschen weit verbreitet sind, die Notwendigkeit einer solchen Maßnahme. Auch im Fall von MRSA konnte bereits gezeigt werden, dass bei Hobbytieren oftmals Sequenztypen gefunden werden, die bekannten Sequenztyp-Linien beim Menschen entsprechen, sodass Hobbytiere als Ursprung von Infektionen mit multiresistenten Erregern unbedingt Berücksichtigung finden müssen [251].

### **Klebsiella spp.**

Über die Verbreitung ESBL-/AmpC-bildender *Klebsiella* spp. bei Tieren ist deutlich weniger bekannt als es für *E. coli* der Fall ist. Meist handelt es sich um Studien mit einer geringen Isolatezahl von z. T. weniger als zehn Isolaten [67, 218, 229] oder um Fallbeschreibungen insbesondere von Mastitiden bei Rindern [265-267]. In einer aus Sicht der Probenanzahl repräsentativeren Studie aus Deutschland konnten Ewers *et al.* unter 1519 klinischen *Klebsiella* spp.-Isolaten 89 (5,9 %) als ESBL-Bildner identifizieren. Von diesen Isolaten wurden 43, die sämtlich dem ST15 zugehörig waren, einem PFGE-Cluster zugeordnet. Die Herkunft einzelner klonaler Isolate aus denselben Kliniken wies auf separate nosokomiale Geschehen hin [215].

In dieser Arbeit war der Anteil von ESBL-/AmpC-bildenden *Klebsiella* spp.-Isolaten bei Hunden mit 32 % (36/113) und bei Katzen mit 33 % (5/15) sehr hoch. Grund hierfür ist zumindest bei den Hunden die Herkunft mehrerer Isolate aus einer Tierklinik, in der es Hinweise auf die Verbreitung verschiedener ESBL-Klone gibt. Bereinigt man diese Zahlen um die klonalen Isolate ergeben sich Werte von 9,5 % (8/84) ESBL-bildender *Klebsiella* spp. bei Hunden. Bei den Katzen muss zudem die geringe Anzahl (n=15) an getesteten Isolaten beachtet werden. Bei Rindern und Schweinen lag die Häufigkeit bei 2,6 % respektive 1,6 % und damit in einem niedrigen Bereich. Vergleichswerte existieren z. B. in dem GERMAP-Bericht nur für aus Mastitisgeschehen isolierte *Klebsiella* spp. Hier lag der Anteil an ESBL-Bildnern 2013 bei rund 8 % (Anzahl untersuchter Isolate: 39) [157]. Trotz der großen Bedeutung von *K. pneumoniae* als Infektionserreger beim Menschen (s. 4.2) wurde diese Spezies bis dato nicht in andere Studien oder Monitoringprogramme aufgenommen. Auch diese Arbeit zeigt, dass ESBL-/AmpC-produzierende *Klebsiella* spp. bei Tieren und insbesondere bei den Hobbytieren keine Rarität darstellen und zudem epidemiologische Zusammenhänge zwischen huma-

nen und tierischen *Klebsiella* spp.-Isolaten zu finden sind (vgl. Diskussion, Kapitel 3). Somit sind weitergehende Untersuchungen bezüglich der Verbreitung mehrfachresistenter *Klebsiella* spp.-Isolate und dem damit verbundenen Risiko für den Menschen dringend notwendig.

### **Vergleich zur Humanmedizin**

In der Humanmedizin gibt es neben zahlreichen Studien zu der Verbreitung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobacteriaceae verschiedene Monitoringprogramme sowie auch Surveillancessysteme zur Ermittlung von Daten zur aktuellen Resistenzlage. Die vom Robert Koch-Institut (RKI) durchgeführte Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS), die 2007 vom Bundesministerium für Gesundheit initiiert wurde und Resistenzdaten von bakteriellen Erregern aus allen klinischen Herkunftsorten zusammenträgt, ergab für das Jahr 2013 eine Resistenzrate gegenüber Cefotaxim für *E. coli* von stationären Patienten von 12,2 % und für *K. pneumoniae* von 15,0 %. Für 2015 lag die Resistenzrate für *E. coli* bei 11,9 % und für *K. pneumoniae* bei 12,2 % (<https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceOverview.aspx>, Stand 22.08.16). Laut des aktuellen Berichts des „European Antimicrobial Resistance Surveillance Network“ (EARS-Net) des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC), das 1998 als Netzwerk nationaler Surveillance-Systeme gegründet wurde, lag die Zahl der invasiven *E. coli*-Isolate mit Resistenz gegenüber 3.-Generations-Cephalosporinen in Deutschland im Jahr 2014 bei 10,5 % (Vergleich 2010: 8,4 %). Bei den invasiven *K. pneumoniae*-Isolaten lag die Zahl mit 12,7 % gleichbleibend hoch (Vergleich 2010: 12,8 %) [1].

Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit getesteten Isolaten von Tieren lässt sich nicht direkt ziehen, da es sich größtenteils um nicht invasive Isolate und auch um Isolate sowohl aus dem ambulanten als auch aus dem stationären Bereich handelt bzw. in einigen Fällen eine Zuordnung nicht erfolgen konnte. Insgesamt lässt sich jedoch sowohl im human- als auch im veterinärmedizinischen Bereich ein steigender Trend an ESBL-/AmpC-Bildnern erkennen. Monitoringprogramme, die in der Humanmedizin und auch im Bereich der Nutztiere existieren, ermöglichen eine Überwachung des Vorkommens von ESBL-/AmpC-Bildnern und somit möglicherweise ein frühes Ergreifen von Maßnahmen, die einer weiteren Verbreitung vorbeugen bzw. diese reduzieren. Als Reaktion auf das vermehrte Vorkommen von Resistenzgenen im Nutztierbereich wurde z. B. eine für den Tierhalter verpflichtende Meldepflicht im Zusammenhang mit dem Antibiotikaeinsatz eingeführt (16. Änderung des Arzneimittelgesetzes). Zudem sind pharmazeutische Unternehmen seit 2011 verpflichtet, Angaben über die Mengen von Antibiotika, die sie an Tierärzte abgeben, an das Deutsche Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) zu melden. Seit Beginn der Erfassung im Jahr 2011 bis zum Jahr 2015 hat sich die Gesamtmenge von an Tierärzten abgegebenen Antibiotika



([http://www.bvl.bund.de/DE/08\\_PresseInfothek/01\\_FuerJournalisten/01\\_Presse\\_und\\_Hintergrundinformatio-](http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformatio-)  
[nen/05\\_Tierarzneimittel/2016/2016\\_08\\_03\\_pi\\_Antibiotikaabgabemenge2015.html](http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformatio-)) halbiert. Daten zu der Auswirkung des verminderten Antibiotikaeinsatzes auf die Resistenzlage bei Tieren gibt es derzeit noch nicht, sodass es weiterhin dringend notwendig ist, Daten zur Verbreitung von resistenten Erregern bei Tieren zu erheben und auch die Hobbytiere, die in den vorhandenen Monitoringprogrammen bislang unzureichend berücksichtigt wurden, mehr in aktuelle Studien einzubinden.

## 2.2 Verteilung und Verbreitung der *bla*-Gene

### *E. coli*

Der Mehrheit der in dieser Arbeit phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten bzw. als AmpC-verdächtig geltenden *E. coli*-Isolate konnten auch genotypisch als solche identifiziert werden. Sechs Isolate entzogen sich der genaueren Differenzierung, hier wäre die Existenz einer eher selten vorkommenden ESBL/AmpC, wie z. B. ADC oder MIR, die mittels weiterer PCR-Untersuchungen oder mittels Genomanalyse identifiziert werden könnte, denkbar. Zwölf Isolate besaßen eine oder auch mehrere Mutationen im Promotorbereich des bei *E. coli* chromosomal kodierten AmpC-Gens, was zu einer Verstärkung des Promotors und dadurch zu einer verstärkten Ablesung des Gens und Hyperproduktion der AmpC führen kann. Eine Mutation bei -18, die eine besondere Rolle bei der Hyperproduktion durch Schaffung einer neuen -10 Box spielt, konnte bei 11 dieser Isolate gezeigt werden [238]. Die Tatsache, dass gleiche Mutationen in der Vergangenheit bei humanen Isolaten nachgewiesen wurden, zeigt einmal mehr, dass Überschneidungspunkte zwischen humanen und tierischen Isolaten vorhanden sind [268].

Unter den übrigen Isolaten, bei denen ein *bla*-Gen nachgewiesen werden konnte, dominierte *bla*<sub>CTX-M-1</sub> mit einem Anteil von 55 % (165/300), gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (22,3 %), *bla*<sub>CMY-2</sub> (9,7 %), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (6 %) und *bla*<sub>SHV-12</sub> (5,7 %). Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen aus anderen Studien. Valentin *et al.* untersuchten 1329 humane und von Tieren stammende ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate auf deren ESBL-Typ. CTX-M-1 war dabei die dominierende ESBL bei den Tieren gefolgt von CTX-M-15. Letztere konnte am häufigsten bei den humanen Isolaten gefunden werden [269]. Die Auswertung von früheren, bis zum Jahr 2011 durchgeführten Studien zur Verbreitung von ESBL-/AmpC-Bildnern ergab, dass CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-14, CMY-2 und SHV-12 die am häufigsten nachgewiesenen Typen bei Tieren waren. CTX-M-1 stellte dabei die dominierende ESBL sowohl bei den LM-liefernden als auch bei den Hobbytieren in Europa dar [4]. Bei Rindern und Schweinen konnte dieses Enzym jedoch noch wesentlich häufiger als bei den Hobbytieren nachgewiesen werden (72 % resp. 28 %) [4]. Diese Beobachtung konnte auch in dieser Arbeit gemacht

werden. Hier machte der Anteil *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-tragender *E. coli*-Isolate bei Schweinen einen Anteil von 76,3 %, bei Rindern von 47,5 % und bei den Hobbytieren von 36,4 % aus. Auch in vielen anderen Studien aus Europa stellt sich CTX-M-1 als der am häufigsten nachgewiesene ESBL-Typ bei Rind und Schwein dar [270, 271]. In der vorliegenden Arbeit wies die Mehrheit der ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* von Hunden die ESBL CTX-M-15 auf. Während in älteren, aber auch in aktuellen Studien oftmals CTX-M-1 am häufigsten bei Hund und Katze nachgewiesen werden konnte [66, 190, 204, 261], werden in einigen neueren Studien immer häufiger ESBL vom CTX-M-15-Typ identifiziert [112, 183]. Das entspricht dem am häufigsten beim Menschen nachgewiesenen Typ [272] und wurde zunächst u. a. auf die Verbreitung von bestimmten klonalen Linien wie z. B. dem ST131 zurückgeführt, der neben CTX-M-15 aber auch Träger vieler anderer *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene sein kann [183, 191]. CTX-M-15 wird aber auch in vielen anderen ST nachgewiesen [182, 273, 274], sodass die Verbreitung unabhängig eines bestimmten ST verläuft.

CTX-M-55, das in dieser Arbeit bei 8,8 % der Isolate vom Schwein nachgewiesen werden konnte, ist dominierend im asiatischen Raum und konnte bisher bei dieser Tierart auch nur dort nachgewiesen werden [123, 275-277]. Auch bei Kleintieren konnte dieser CTX-M-Typ im asiatischen Raum und in Europa vereinzelt gefunden werden [72, 278, 279]. Während dieses Enzym vor 2010 beim Menschen nicht nachgewiesen werden konnte, ist in den letzten Jahren ein starker Anstieg zu beobachten, sodass es sich in China bei CTX-M-55 mittlerweile um die am zweithäufigsten nachgewiesene ESBL beim Menschen handelt [201, 277]. In anderen Kontinenten tritt dieser ESBL-Typ beim Menschen nach wie vor sehr selten auf [280-282].

Bis 2012 konnte die ESBL CTX-M-14, die bei LM-liefernden Tieren relativ häufig vorkommt, bei Hobbytieren nicht nachgewiesen werden [4]. Die beteiligten Sequenztypen sind dabei sehr variabel, so konnten z. B. Liao *et al.* (2015) bei 14 CTX-M-14-produzierenden *E. coli* von Nutztieren 11 verschiedene Sequenztypen ausmachen [283]. Die Tatsache, dass CTX-M-14 in dieser Arbeit nur bei einem *E. coli*-Isolat von einem Hund gefunden wurde, deutet gemeinsam mit anderen beschriebenen Einzelnachweisen auf eine weiterhin geringe Prävalenz in der Hobbytierpopulation hin [261, 284]. Auffällig ist zudem, dass in der vorliegenden Arbeit 72,4 % der nachgewiesenen CMY-2-Enzyme bei Hunden gefunden werden konnten, was einem Anteil bei den Hundeisolaten von 28,8 % entsprach. Dieser AmpC-Typ wird in Asien und Nordamerika bei LM-liefernden Tieren sehr häufig nachgewiesen, in Europa am meisten bei Geflügel und seltener bei Schweinen und Rindern [21, 123, 188, 285, 286]. CMY-2-produzierende *E. coli* kommen durchaus auch bei Hunden und Katzen vor, der Anteil ist in den meisten Studien jedoch deutlich geringer [66, 74, 204]. In einigen Studien ist der Anteil jedoch vergleichend hoch bzw. höher [287, 288] und ging in einer Arbeit auch mit einer hohen Diversität der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden Plasmide einher [287]. Diese Diversität lässt sich

z. T. auch bei den beteiligten Sequenztypen beobachten [274], was insgesamt die Verbreitung von CMY-2 erleichtern und auch das vorwiegende Vorkommen von CMY-2 aus der Familie der CMY- $\beta$ -Laktamasen erklären könnte. Eine weitere Erklärung könnte der häufige Einsatz von Cefalexin bei Hunden und Katzen darstellen, da in einer Studie der Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Cefalexin und dem erhöhten Nachweis von CMY-2 bei Hunden hergestellt werden konnte [289]. Dabei konnte bei fünf von acht untersuchten Hunden ein Inc11/ST2-Plasmid als Träger des *bla*<sub>CMY-2</sub>-Gens identifiziert werden, was auch bei Haenni *et al.* (2014) bei 17 von 22 untersuchten CMY-2-produzierenden *E. coli*-Isolaten gefunden werden konnte und auf eine vorwiegende Selektion dieses Plasmids hindeuten könnte [288]. In dieser Arbeit wurde ein Hund, bei dem CMY-2 nachgewiesen wurde, nachweislich mit Cefalexin vorbehandelt.

### **Klebsiella spp.**

Von den phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten oder als AmpC-verdächtig geltenden *Klebsiella* spp.-Isolaten konnten fünf genotypisch nicht näher differenziert werden. Die Diversität der ESBL-/AmpC-Typen bei den übrigen 60 Isolaten war deutlich geringer als bei *E. coli*. CTX-M-15 konnte bei fast der Hälfte der *Klebsiella* spp.-Isolate nachgewiesen werden (45,5 %), zwei Drittel stammten dabei von Hunden, von denen jedoch auch insgesamt die meisten *Klebsiella* spp.-Isolate stammten. Etwa ein Viertel (25,5 %) der *Klebsiella* spp.-Isolate trugen das AmpC-Gen *bla*<sub>DHA-1</sub>, 16,4 % das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>.

In den wenigen bisher verfügbaren Studien zu der Verteilung von ESBL-/AmpC-Typen bei *Klebsiella* spp. von Tieren konnte CTX-M-15 als die häufigste ESBL identifiziert werden [215, 218, 229]. Auch in der Humanmedizin handelt es sich um die am weitesten verbreitete ESBL bei *K. pneumoniae* [215]. Oftmals konnte in veterinärmedizinischen Studien eine Zuordnung der CTX-M-15-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate zum ST15 erfolgen, einem Klon, der in der Humanmedizin weltweit verbreitet ist [216, 229, 290, 291]. Auch in dieser Arbeit waren CTX-M-15 und ST15 stets miteinander assoziiert. Die CTX-M-15-ST15-*K. pneumoniae*-Isolate stammten dabei aus vier verschiedenen Veterinärkliniken, wovon 19 Isolate einer Klinik zuzuordnen waren. Sie konnten im Zeitraum von 10/2012 bis 01/2014 von 17 verschiedenen Patienten isoliert werden und wiesen große Ähnlichkeiten im Resistenzgenprofil auf, weswegen neben einem wiederholten Eintrag auch ein nosokomiales Geschehen vermutet werden kann. Die zur Erhärtung dieser Hypothese notwendigen weiterführenden Untersuchungen wurden im Hinblick auf den erstmaligen und wiederholten Nachweis von OXA-48-Carbapenemasen bei Tieren in dieser Arbeit für die 14 OXA-48-positiven CTX-M-15-ST15-*K. pneumoniae*-Isolate durchgeführt. Tatsächlich konnte mittels Analyse von Makrorestriktions- und Plasmidprofilen die Klonalität dieser Isolate nachgewiesen werden und die Hypothese einer nosokomialen Verbreitung erhärtet werden.

Elf der 15 DHA-1-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate, die allesamt von Kleintieren stammten, konnten dem ST11 zugeordnet werden, eine Kombination, die schon in humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Studien in Spanien, der Schweiz, Tschechien und Korea beschrieben wurde [228, 292-294]. Hidalgo *et al.* konnten sieben klinische *K. pneumoniae*-Isolate von Hunden und Katzen dem ST11 zuordnen und neben *bla*<sub>DHA-1</sub> zusätzlich das PMQR-Gen *qnrB4* nachweisen, das in dieser Arbeit ebenfalls bei allen DHA-1-positiven Isolaten gefunden werden konnte. Dahingegen besaßen in dieser Arbeit nur acht ST11-DHA-1-Isolate die  $\beta$ -Laktamase SHV-11, die Hidalgo *et al.* ebenfalls bei allen Isolaten nachweisen konnten [228]. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um einen weiteren epidemischen Klon, der mit der Verbreitung bestimmter Resistenzgene verknüpft ist, handelt. Vier weitere DHA-1-produzierende *K. pneumoniae* konnten dem ST895, einer Single Locus-Variante des ST11, zugeordnet werden. Diese Isolate traten im ähnlichen Zeitraum, jedoch zeitlich etwas versetzt zu den ST11-DHA-1-Varianten auf und stammten größtenteils (3 von 4 Isolaten) aus derselben Klinik. Ob der Nachweis dieser ST11-Variante erste Selektions- und Anpassungsprozesse des ursprünglichen Klons widerspiegelt, kann nur in weiterführenden Untersuchungen unter Einbeziehung chronologisch gewonnener Isolate z. B. mittels Gesamtgenomanalysen geklärt werden.

## **2.3 Pathotypen bei ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli***

### **2.1.1 InPEC**

In dieser Arbeit wurden alle aus dem MDT stammenden ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*-Isolate von Rind und Schwein auf die für die jeweiligen relevanten Pathovaren (ETEC, EDEC, EPEC, STEC) typischen VAGs untersucht (siehe dazu 4.1). Einige Berichte zu ESBL-/AmpC-bildenden STEC sind sowohl aus der Human- als auch aus der Veterinärmedizin bekannt (Tabelle 36), insgesamt sind sie jedoch selten. Da EHEC-Infektionen, sofern sie sich auf eine hämorrhagische Enteritis beschränken, i. d. R. nicht mit Antibiotika behandelt werden, könnte der dadurch bedingte fehlende Selektionsdruck der Grund für die eher seltenen Funde in der Humanmedizin sein [295]. Im Gegensatz zum Menschen sind Rinder oftmals symptomlos mit STEC infiziert bzw. kolonisiert. Hier könnte sich also jede Gabe von antimikrobiellen Substanzen aufgrund anderer Erkrankungen auch auf die Resistenzentwicklung von STEC auswirken. In dieser Arbeit konnte jedoch keiner der ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*-Isolate aus dem MDT von Rindern als STEC identifiziert werden. Die *E. coli*-Isolate, die aus anderen Proben von Rindern (n=6) stammten, wurden nicht auf VAGs untersucht. Ob das insgesamt eher seltene Vorkommen von STEC in Probenmaterial oder die Annahme, dass STEC nur in geringem Maße ESBL-/AmpC-Plasmide aufnehmen, ursächlich für die

sporadischen Funde von STEC-ESBL bei Rindern sind, lässt sich innerhalb dieser Arbeit nicht bewerten.

Positiv für das Shigatoxin 2e konnte hingegen ein CTX-M-1-produzierendes Isolat aus dem Kot eines Schweins getestet werden. Das *fedA*-Gen, das für die F18-Fimbrien kodiert, konnte bei dem besagten Isolat jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass es sich nicht um ein porcines EDEC-Isolat im klassischen Sinne handelt. Der frühere Nachweis von *stx2e*<sup>+</sup>- und *fedA*<sup>+</sup>-*E. coli*-Isolaten aus an Ödemkrankheit erkrankten Ferkeln und aus 30 unter Diarrhoe leidenden Ferkeln zeigt jedoch, dass eine klinische Bedeutung dieser Stämme angenommen werden muss [240]. Da an Durchfall erkrankte Ferkel oftmals mit antimikrobiellen Substanzen wie  $\beta$ -Laktam-Antibiotika oder Tetracyclinen behandelt werden [296], können sich bei Vorhandensein einer ESBL in Kombination mit dem Phänomen der Co-Resistenz Probleme hinsichtlich der Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen und somit für die antibiotische Therapie ergeben. Beim Menschen können Infektionen mit *Stx2e*-produzierenden *E. coli* symptomlos verlaufen, sie werden aber auch mit Diarrhoe und sogar mit der Ausbildung eines HUS in Verbindung gebracht [297, 298]. Ein zoonotisches Potential dieser atypischen porcinen *stx2e*<sup>+</sup>-*E. coli*-Stämme kann also nicht ausgeschlossen werden. Bisher wurde erst einmal das Vorkommen porciner Shigatoxin-/ESBL-bildender *E. coli* beschrieben [299]. Jedoch erfolgte hier keine Bestimmung von eventuell vorhandenen Fimbrientypen, sodass auch hier nicht von einem EDEC im engeren Sinn gesprochen werden kann.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit acht CTX-M-1-bildende *E. coli*-Isolate vom Schwein aufgrund des Nachweises der Gene *estb*, *estap*, *elt*, *f4* und *f18* dem ETEC-Pathovar zugeordnet werden. ETEC-assoziierte Durchfälle betreffen typischerweise Ferkel und gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Während ETEC mit F4-Fimbrien v. a. bei neugeborenen und frisch abgesetzten Ferkeln Durchfälle und Todesfälle verursachen, führen ETEC mit F18-Fimbrien eher bei bereits länger abgesetzten Ferkeln zu Durchfällen [300]. Beim Menschen sind ETEC besonders in Entwicklungsländern wichtige Verursacher von Durchfall bei Kleinkindern und von Reisediarrhoe [147]. Die bei den ETEC-Stämmen von Rind und Schwein vorkommenden Adhäsionsfaktoren (F4-, F5-, F6-, F17-, F18- und F41-Fimbrien) sind basierend auf der Expression bestimmter Rezeptoren im Zielgewebe tierspezifisch. Man geht daher davon aus, dass sie gewöhnlich keine Infektionen beim Menschen auslösen können und somit keine Zoonosegefahr darstellen [301]. Untersuchungen zu der Verbreitung ESBL-bildender ETEC-Stämme bei Schweinen gibt es bisher nur wenige. Abraham *et al.* konnten 2014 bei 70 untersuchten ETEC-Stämmen von Schweinen in Australien keine Resistenz gegenüber Cephalosporinen nachweisen [302]. In einer Studie aus Kanada konnte bei 13 von 83 untersuchten porcinen ETEC-Isolaten eine Resistenz gegenüber Cefotiofur nachgewiesen werden. Die Bestätigung einer ESBL-Bildung wurde allerdings nicht

durchgeführt [303]. Kim *et al.* konnten unter 111 ETEC-Isolaten sieben als ESBL-Bildner identifizieren und auch Wu *et al.* beschrieben drei CTX-M-1-produzierende ETEC-Isolate in ihrer Studie [198, 304] (Tabelle 36). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der von 97 ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*-Isolaten aus dem MDT von Schweinen acht (8,2%) als ETEC identifiziert werden konnten, zeigen diese Studien, dass ESBL durchaus v. a. unter den porcinen ETEC-Isolaten verbreitet sind. Unter den ESBL-bildenden *E. coli* vom Schwein konnten außerdem zwei atypische EPEC-Isolate, die durch das Vorhandensein von *eae* bei Abwesenheit von *bfp* definiert sind, gefunden werden. Wu *et al.* wiesen in ihrer Studie ebenfalls atypische EPEC (n=37 von 295 untersuchten ESBL-bildenden *E. coli* von Tieren) nach. Diese stammten aber ausschließlich von Wiederkäuern und vom Geflügel [198]. Typische EPEC verursachen beim Menschen v. a. in Entwicklungsländern Durchfall bei Kleinkindern; sie können aber auch beim erwachsenen, immunsupprimierten Menschen Erkrankungen auslösen. Sie kommen beim Tier nur sporadisch vor [150, 305]. Atypische EPEC kommen in erster Linie beim Tier vor und können auch hier Durchfall auslösen. Die Bedeutung beim Menschen wird kontrovers diskutiert [150, 305]. Es gibt aber mittlerweile mehrere Berichte, in denen Durchfallgeschehen auch beim erwachsenen Menschen mit atypischen EPEC in Verbindung gebracht werden [305]. In einigen Studien konnten atypische EPEC von Tieren isoliert werden, die Serogruppen, die in humane Durchfallgeschehen involviert waren, zugeordnet werden konnten. Tiere können also eventuell als Reservoir für durch atypische EPEC ausgelöste Durchfallerkrankungen beim Menschen fungieren [306]. Es muss also davon ausgegangen werden, dass atypische EPEC ein zoonotisches Potential aufweisen, was bei dem zusätzlichen Vorkommen einer ESBL-/AmpC Auswirkungen auf die therapeutischen Optionen hätte.

**Tabelle 36: Übersicht über bisher veröffentlichte Studien zu dem Vorkommen von InPEC-ESBL/InPEC-AmpC**

Patho- typ	ESBL-/AmpC- positive/untersuchte <i>E. coli</i> -Isolate	ESBL-Typ	Herkunft	Land	Referenz
STEC	1/1	CTX-M-18	Mensch	Japan	[307]
STEC	1/1	CTX-M-3	Mensch	Japan	[308]
STEC	1/302	TEM-52	Mensch	Belgien	[309]
STEC	2/333	CTX-M-1	Mensch	Indien	[310]
STEC	1/k. A.	CTX-M-28	Mensch	Dänemark	[311]
STEC	1/1	CTX-M-15	Mensch	Deutschland	[312]
STEC	7/2167	CMY-2	Mensch	Japan	[313]

Fortsetzung Tabelle 36

Patho- typ	ESBL-/AmpC- positive/untersuchte <i>E. coli</i> -Isolate	ESBL-Typ	Herkunft	Land	Referenz
<b>STEC</b>	1/1	CTX-M-15	Kalb	Frankreich	[314]
<b>STEC</b>	2/149	CTX-M-1	Kalb	Deutschland	[295]
<b>STEC</b>	2/170	CTX-M-15	Schwein	Indien	[299]
<b>STEC</b>	1/247	CTX-M-Gr. 2	Geflügel	Niederlande	[315]
<b>EHEC</b>	-/-	CTX-M-15	Mensch	Deutschland	[316]
<b>EHEC</b>	17/17	CMY-2	Mensch	Japan	[317]
<b>EHEC</b>	1/1	CTX-M-1	Rind	Frankreich	[318]
<b>ETEC</b>	3/629	CTX-M-1	Rind, Schwein	Deutschland, Niederlande, UK	[198]
<b>ETEC</b>	7/111	CTX-M-12, - 14, -15	Schwein	Südkorea	[304]
<b>ETEC</b>	8/97	CTX-M-1	Schwein	Deutschland	diese Arbeit
<b>tEPEC+ aEPEC</b>	8/350	CTX-M-1	Mensch	Iran	[319]
<b>EPEC (n.n.d.)</b>	13/13	TEM-116, PER-2	Mensch	Uruguay	[320]
<b>aEPEC</b>	2/273	k. A.	Mensch	Norwegen	[321]
<b>aEPEC</b>	1/1	CTX-M-15	Mensch	China	[322]
<b>aEPEC</b>	37/295	k. A.	Wdk., Geflü- gel	Deutschland, Niederlande, UK	[198]
<b>EPEC</b>	2/52	k. A.	Kaninchen	Portugal	[323]
<b>aEPEC</b>	2/97	CTX-M-1, TEM-52	Schwein	Deutschland	diese Arbeit

k. A.: keine Angaben; n = Anzahl; Wdk.: Wiederkäuer; UK: vereinigtes Königreich; aEPEC: atypische EPEC; tEPEC: typische EPEC; n.n.d.: nicht näher differenziert

Jede orale Gabe von Antibiotika hat einen Einfluss auf die gesamte Mikrobiota des Darms, der sich in erster Linie in der verminderten Ansiedlung von kommensalen Bakterien äußert [324]. Wird bei dem Vorhandensein von ESBL-/AmpC-bildenden InPEC-Isolaten oder bei Vorliegen einer anderen Erkrankung eine orale Antibiotikagabe durchgeführt, besteht die Möglichkeit einer Selektion von Virulenzgen-tragenden *E. coli* und einer vermehrten Verbreitung der Virulenzgene in der *E. coli*-Population. Besteht bei den betroffenen InPEC ein zoonotisches Potential, ergibt sich dadurch ein höheres Risiko für den Menschen, sich z. B. durch direkten Kontakt oder durch kontaminierte Lebensmittel mit solchen Vertretern der Spezies *E. coli* zu infizieren. Gleichzeitig wird die Therapie von Erkrankungen mit ESBL-tragenden InPEC-Isolaten auch im Hinblick auf eine eventuell vorhandene Co-Resistenz in den betroffenen Betrieben erschwert und es kann zu höheren wirtschaftlichen Verlusten kommen. ESBL-bildende InPEC-Isolate von Tieren können zudem ein Reservoir für ESBL-

Gene darstellen und zu einer Verbreitung in beiden Populationen (Tier-Mensch) führen. Auffällig ist, dass nur bei einem ESBL-bildenden InPEC-Isolat zusätzlich ein PMQR-Gen (*qnrS1*) gefunden werden konnte. Diese Tatsache unterstützt zusammen mit der eher selten vorhandenen Kombination ESBL-Bildner/InPEC die Theorie, dass pathogene *E. coli* insgesamt seltener Träger von Resistenzgenen zu sein scheinen als kommensale *E. coli* (siehe auch 4.1).

### 2.1.2 ExPEC

Zur Identifizierung von ExPEC-Isolaten unter den ESBL-/AmpC-Bildnern erfolgte zuerst eine Einteilung der *E. coli*-Isolate in die von Clermont *et al.* definierten phylogenetischen Gruppen [138]. Die Mehrheit der Isolate, zu denen auch 8 von 9 ESBL-positive InPEC-Isolate gehörten, konnte den Gruppen A (n=132; 41,5 %) und B1 (n=79; 24,8 %) zugeordnet werden (s. Abbildung 12). Die Phylogruppen A und B1 beinhalten hauptsächlich kommensale *E. coli* bzw. im Hinblick auf extraintestinale Infektionen in der Regel nicht- oder schwach virulente Stämme. Diese Beobachtung geht mit Ergebnissen anderer Studien einher, in denen als multiresistent benannte *E. coli* eher den schwach virulenten Gruppen wie A und B1 zugeordnet werden konnten. In der Gruppe A befinden sich laut der Autoren häufiger multiresistente *E. coli* als in anderen Gruppen [168, 284], was bedeuten würde, dass diese auch häufig schwächer virulent sind als Antibiotika-sensible Stämme [162, 165]. Dennoch konnten in dieser Arbeit 12 Isolate der Gruppe B2, in der sich überwiegend hochvirulente ExPEC-Isolate befinden, zugeordnet werden. Gleichzeitig wurden 18 bzw. 23 Isolate der Gruppe D und der aus der Gruppe B2 hervorgegangenen Gruppe F, in denen sich ebenfalls hochvirulente Stämme befinden können, zugewiesen [138]. Diese als potentielle ExPEC eingestuft Isolate wurden mittels MLST und Virulenzgentyisierung näher untersucht.

Drei Isolate konnten dem ST131 zugeordnet werden, bei dem es sich um einen weltweit vorkommenden Klon handelt, der einen wesentlichen Teil zu der Verbreitung von FQ- und von Cephalosporin-Resistenzen innerhalb der Spezies *E. coli* beigetragen hat [325]. Die FQ-Resistenzen sind in den letzten Jahren bei *E. coli* vom ST131 stark angestiegen. Eine Typisierung des Gens für die Typ 1 Fimbrie (*fimH*) ermöglicht eine genauere Einteilung der ST131-*E. coli*-Isolate in Subklone. So konnte die gestiegene Ciprofloxacin-Resistenz bei *E. coli* vom ST131 mit einer Verlagerung von Ciprofloxacin-sensiblen Subklonen (*fimH22*) zu Ciprofloxacin-resistenten Subklonen (*fimH30*) in Verbindung gebracht werden [325]. Auch zwei der drei in dieser Arbeit nachgewiesenen ST131-*E. coli*-Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin und auch Enrofloxacin- ein entsprechender PMQR konnte jedoch bei allen drei Isolaten nicht nachgewiesen werden. Diese Ciprofloxacin-resistenten Isolate wiesen die ESBL CTX-M-15 auf, ein Zusammenhang, der schon häufig beobachtet wurde [325]. Das dritte ST131-Isolat besaß die ESBL CTX-M-14. Diese Kombination ist seltener, konnte aber bereits in der Humanmedizin im asiatischen Raum beschrieben werden [326].



Auch bei Tieren konnten *E. coli* vom ST131 sowohl in Kombination mit als auch ohne ESBL-Plasmide bereits häufiger nachgewiesen werden [74, 186, 187, 191, 192]. Die in dieser Arbeit gefundenen ST131-*E. coli* stammten aus dem Kot von zwei Schweinen unterschiedlicher Herkunft und aus dem Urin einer Katze. Letzteres und eines der beiden porcinen Isolate besaßen 20 verschiedene VAGs, das andere porcine Isolat wies sogar 30 VAGs auf. Darunter befanden sich u. a. für B2-Stämme typische VAGs wie *sat* (secreted autotransporter toxin), *fyuA* (yersiniabactin receptor) und *malX* (pathogenicity island marker) [154]. Der MDT von Mensch und Tier wurde wiederholt als Reservoir für ST131-*E. coli* beschrieben [327]. So handelt es sich auch bei den beiden porcinen Isolaten vermutlich um symptomlose Besiedler des Darms, die außerhalb des Verdauungstrakts zu Infektionen führen können, was auch bei Schweinen schon beschrieben wurde [328]. In einigen Studien konnte eine hohe Ähnlichkeit zwischen uropathogenen ST131-*E. coli* beim Menschen und Isolaten dieses ST von Tieren, die zeitlich und geographisch im Zusammenhang standen, festgestellt werden [193, 329, 330]. Dies veranlasste Nordstrom *et al.* dazu für die Art dieser Erkrankungen den Terminus FUT1 (Foodborne urinary tract infection) einzuführen [331]. Die Autoren diskutierten die Möglichkeit, dass über kontaminiertes Fleisch übertragene Bakterien nach Übertreten der Darmschranke eine Infektion des unteren Harnwegsapparates verursachen könnten [331]. Ein ähnliches Szenario wäre für das in dieser Arbeit nachgewiesene B2-ST131-CTX-M-15-*E. coli*-Isolat aus dem Urin einer Katze denkbar. Eine primäre Besiedlung des Darms der betroffenen Katze hätte jedoch nur durch eine zusätzliche Kotuntersuchung nachgewiesen werden können, die retrospektiv nicht mehr aussagekräftig ist. Da die Katze zum Zeitpunkt der Isolierung stationär in einer Tierklinik behandelt wurde, wäre aber auch eine dort erfolgte Infektion mit dem ST131-*E. coli* denkbar.

Die übrigen ST, die unter den B2-ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten (ST141, ST372, ST73), kommen vorwiegend beim Menschen und in deutlich selteneren Fällen in Kombination mit einer ESBL/AmpC vor [4, 199, 332, 333]. *E. coli* vom ST73 werden häufig bei UPEC vom Menschen nachgewiesen, beim Tier hingegen sind sie selten und werden eher bei Hobbytieren als bei LM-liefernden Tieren gefunden [334-337], was erneut zeigt, dass Hobbytiere hinsichtlich der gefundenen Genotypen eher eine Schnittmenge mit Menschen aufweisen als LM-liefernde Tiere. Der Nachweis eines DHA-1-produzierenden B2-ST73-*E. coli*-Isolats in der Lunge eines wildlebenden Seehunds, der im März 2012 auf Sylt tot aufgefunden wurde, ist zudem bisher einmalig. Es konnte anhand seines Transponders nachvollzogen werden, dass er sich im Jahr 2011 in stationärer Behandlung in der Seehundstation Pieterburen in den Niederlanden befand und dort im Jahr 2011 mit Amoxicillin und Marbofloxacin behandelt worden ist, bevor er im Oktober 2012 wieder ausgesetzt wurde. Durch die erfolgte Antibiotika-Gabe ist die Selektion des DHA-1-bildenden *E. coli* bei diesem Wildtier erklärbar. Fraglich ist allerdings, warum dieser auch

nach einem halben Jahr ohne weiteren bekannten Selektionsdruck in dem Seehund nachgewiesen werden konnte. Es ist aber zudem auch eine Kolonisierung mit aus der Umwelt stammenden *E. coli* mit antimikrobiellen Resistenzen in Betracht zu ziehen, da diese bereits häufig von anderen Wildtieren [160, 338] und auch aus Wasserproben inklusive Meerwasser isoliert werden konnten [339, 340].

Der Nachweis ESBL-/AmpC-bildender *E. coli*-Isolate mit den Sequenztypen ST405, ST38 und ST69 aus der phylogenetischen Gruppe D, die allesamt bereits häufig aus Infektionsgeschehen bei Menschen und Tieren auch in Kombination mit der Trägerschaft von ESBL-/AmpC-Plasmiden isoliert werden konnten, unterstreicht die weite Verbreitung dieser Genotypen bei Tieren [4, 74, 107, 199, 341]. Auch der erst kürzlich bei Hobbytieren und vielfach in der Humanmedizin beschriebene ST648 aus der Phylogruppe F konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden [183, 200, 342]. Diese Nachweise lassen Spekulationen über einen direkten oder über die Umwelt erfolgenden Interspeziestransfer zu. Die F-ST648-*E. coli*-Isolate, die entsprechend früherer Studien und auch in dieser Arbeit ähnlich wie der ST131 häufig mit der ESBL CTX-M-15 verknüpft sind, könnten ein Grund für die zunehmende Prävalenz von der beim Menschen am häufigsten nachgewiesenen ESBL CTX-M-15 bei tierischen Isolaten sein. Die zudem für den ST648 beschriebene Fähigkeit, Multiresistenz und Virulenz erfolgreich zu verknüpfen (s. 5.1) [183], trifft auch für die ST648-Isolate aus dieser Arbeit zu- im Schnitt trugen sie 11 VAGs und zeigten oftmals eine kombinierte Resistenz gegenüber Cephalosporinen und Fluorchinolonen.

## **2.4 Vorkommen plasmidkodierter Fluorchinolonresistenzgene („PMQR“) bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *E. coli* und *Klebsiella* spp.-Isolaten**

Bei 50 % der 318 in dieser Arbeit untersuchten ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *E. coli*-Isolate konnte phänotypisch mittels Agardiffusionstest eine FQ-Resistenz nachgewiesen werden, 44 % zeigten eine kombinierte Cephalosporin-/FQ-Resistenz. Bei 21,6 % konnte tatsächlich ein oder mehrere PMQR-Mechanismen auf genetischer Ebene nachgewiesen werden. Am häufigsten vertreten waren dabei Gene für die Aminoglykosid-Acetyltransferase *Aac*(6')-Ib-cr und die Qnr-Proteine *QnrS1* und *QnrB2*. Eine kombinierte Cephalosporin-/FQ-Resistenz lag bei 68,5 % der 54 ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen *K. pneumoniae*-Isolaten vor, eine alleinige Resistenz gegenüber Ciprofloxacin trat bei 83,3 % auf. Bis auf ein Isolat besaßen alle untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate tatsächlich mindestens einen PMQR-Mechanismus. Die Effluxpumpen *OqxA* und *OqxB* sowie die Aminoglykosid-Acetyltransferase *Aac*(6')-Ib-cr konnten dabei am häufigsten nachgewiesen werden. Die *K. pneumoniae*-Isolate wiesen deutlich häufiger als die Vertreter der Spezies *E. coli* mehrere

PMQR-Mechanismen in Kombination auf. Das gleichzeitige Vorkommen einer phänotypischen Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und Cephalosporinen der 3. und 4. Generation deutet auf das Vorliegen von multiresistenten Erregern hin. Bei der Definition von Multiresistenz muss beachtet werden, dass das Vorhandensein einer ESBL/AmpC oder einer Carbapenemase nicht mit dem Vorliegen einer Multiresistenz, das heißt mit der Resistenz gegenüber mehreren Antibiotika(gruppen) gleichzusetzen ist. So können Bakterien, die z. B. eine ESBL/AmpC besitzen allein gegen Cephalosporine resistent sein, womit die Voraussetzungen einer Multiresistenz nicht erfüllt sind. Die KRINKO (Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention) definiert Multiresistenz bei gramnegativen Infektionserregern (MRGN) anhand der fehlenden *in vitro*-Empfindlichkeit des untersuchten Isolats gegenüber bestimmten Antibiotika(gruppen) (Piperacillin, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone). Diese Antibiotika(gruppen) stellen wichtige, zur Therapie von durch gramnegativen Infektionserreger verursachten lebensbedrohlichen systemischen Infektionen eingesetzte Wirkstoffe dar. Ein Isolat mit einer Resistenz gegenüber 3 der 4 genannten Wirkstoffe wird als 3MRGN, ein Isolat mit einer Resistenz gegenüber allen 4 genannten Wirkstoffen als 4MRGN bezeichnet. Ist nur eine Resistenz gegenüber 2 Wirkstoffen vorhanden, handelt es sich laut KRINKO nicht um einen multiresistenten gramnegativen Erreger [343]. Durch die fehlende Testung eines Acylureidopenicillins wie z. B. des Piperacillins kann in dieser Arbeit nicht abschließend bewertet werden ob es sich bei den ESBL-/AmpC-produzierenden *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten um 3MRGN im Sinne der KRINKO-Definition handelt.

Auch Schmiedel *et al.* (2014) kamen zu ähnlichen Ergebnissen [112]. Sie konnten bei 126 untersuchten ESBL-bildenden *E. coli* 26 (20,6 %) Isolate identifizieren, die zusätzlich einen oder mehrere PMQR-Mechanismen aufwiesen. Bei den *K. pneumoniae*-Isolaten waren es 61,8 %. Am häufigsten traten *aac(6')-Ib-cr* gefolgt von *qnrD* und *qnrB* auf. Das Vorkommen von *oqxAB* wurde allerdings nicht untersucht. Die Co-Existenz von ESBL- und PMQR-Genen konnte zudem bei 31 von 202 untersuchten *E. coli*-Isolaten, die aus den Kloaken von Hühnern stammten, in einer chinesischen Studie von Li *et al.* (2014) gezeigt werden [344]. Bei Donati *et al.* (2014) wiesen 16 von 19 untersuchten *Klebsiella* spp.-Isolaten mindestens ein PMQR-Gen auf, meistens jedoch *qnr* oder *aac(6')-Ib-cr*, auf *oqxAB* wurde nicht untersucht [229]. Auch Ma *et al.* (2009) konnten bei sieben von neun Ceftiofur-resistenten *K. pneumoniae*-Isolaten und bei 25 von 89 *E. coli*-Isolaten PMQR-Mechanismen finden. Auch hier dominierte *Aac(6')-Ib-cr*, das Vorkommen von *OqxAB* wurde ebenfalls nicht untersucht [71].

In der Humanmedizin wurde das Phänomen der Co-Resistenz bei ESBL-/AmpC-bildenden Enterobacteriaceae bereits mehrfach beschrieben [7, 345]. Auch wenn in dieser Arbeit die Co-Existenz der ESBL-/AmpC- und PMQR-Gene auf demselben Plasmid nicht überprüft

wurde, so gibt es jedoch andere Studien, die diese häufige Verknüpfung belegen [338, 346, 347]. Aus dieser Problematik ergeben sich Konsequenzen für den Einsatz von antimikrobiellen Substanzen in der Therapie von Infektionskrankheiten. Zum einen besteht die Gefahr der Resistenzbildung durch Co-Selektion durch die Gabe einer der antimikrobiellen Substanzen, für die Resistenzgene gemeinsam auf einem Plasmid lokalisiert sind. Die (Fluor-)chinolone werden in deutschen Krankenhäusern nach den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika am zweithäufigsten eingesetzt [258]. Die jährliche Abgabemenge ist in der Veterinärmedizin innerhalb von drei Jahren um ca. 50 % gestiegen (2011: 8,2 t, 2014: 12,3 t) [348]. Im Jahr 2015 konnte jedoch erstmals wieder ein Absinken der Fluorchinolone-Abgabe beobachtet werden (10,6 t) ([http://www.bvl.bund.de/DE/08\\_PresseInfothek/01\\_FuerJournalisten/01\\_Presse\\_und\\_Hintergrundinformatio-nen/05\\_Tierarzneimittel/2016/2016\\_08\\_03\\_pi\\_Antibiotikaabgabemenge2015.html](http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformatio-nen/05_Tierarzneimittel/2016/2016_08_03_pi_Antibiotikaabgabemenge2015.html)). Da eine Selektion von ESBL-/AmpC-Genen allein durch die Gabe von Fluorchinolonen ohne den Einsatz von Cephalosporinen möglich ist [123], wäre der Anstieg und die Häufigkeit der Verwendung von FQs als eine der möglichen Ursachen der Häufigkeit von ESBL-/AmpC-Bildnern zumindest bei den Tieren, bei denen Fluorchinolone zum Einsatz kommen, denkbar. Zum anderen ergibt sich durch das Vorliegen mehrerer Resistenzen die Gefahr eines Therapienotstandes infolge von Einschränkungen in Bezug auf die zur Verfügung stehenden Antibiotika. Ein Zurückgreifen auf „critically important substances“ aus der Humanmedizin, zu denen u. a. die Carbapeneme zählen, wäre zumindest in der Kleintiermedizin möglich, birgt jedoch auch hier Risiken einer Resistenzbildung.

### **3. Carbapenemase-produzierende *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate**

#### **3.1 Nachweis von OXA-48-bildenden Enterobacteriaceae bei Tieren**

Alle unter 1.3 genannten *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate wurden auch auf eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen (Meropenem) untersucht. Die im Initialscreening positiv getesteten *E. coli*- (n=5) und *Klebsiella* spp.-Isolate (*K. pneumoniae*: n=35, *K. oxytoca*: n=1) erwiesen sich auch im Bestätigungstest (Modified Hodge Test) als positiv. Diese Isolate, die von 31 verschiedenen Hunden und zwei Katzen stammten, trugen die zum Zeitpunkt der Untersuchung bei Tieren noch nicht beschriebene plasmidkodierte Carbapenemase vom Typ OXA-48. In der Humanmedizin wurde über das Vorkommen OXA-48-bildender Enterobacteriaceae erstmals 2003 in der Türkei berichtet [349]. Nach vielen weiteren Berichten aus der Türkei z. T. auch über nosokomiale Ausbrüche ist diese Carbapenemase mittlerweile zusätzlich im westlichen Teil von Europa nachzuweisen und hier ebenfalls

Ursache für nosokomiale Ausbrüche. Neben der Türkei, in der eine endemische Verbreitung vorliegt, werden auch andere Staaten wie Ägypten oder Libyen als ein Reservoir für OXA-48 angesehen [85]. Am häufigsten Träger dieser Carbapenemase ist die Spezies *K. pneumoniae*, aber auch *E. coli* und seltener andere Enterobacteriaceae [13, 14, 97, 230, 350, 351] (s. 2.3.2.1). In Deutschland wurde OXA-48 erstmals im Jahr 2012 beschrieben. Die OXA-48-positiven Isolate (1x *E. coli*, 4x *K. pneumoniae* und 1x *E. cloacae*) stammten dabei aus den Jahren 2008-2010 von verschiedenen Patienten aus Berlin, Nordrhein-Westfalen und Süddeutschland und konnten aus unterschiedlichen Lokalisationen wie z. B. Urin, Wunden und Trachealaspiraten/-kanülen isoliert werden [350]. In Deutschland handelt es sich mittlerweile um die am häufigsten nachgewiesene Carbapenemase [15].

Das Vorkommen dieser Carbapenemase bei Tieren wurde zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht beschrieben. Mittlerweile gibt es jedoch Berichte über Nachweise von OXA-48 ebenfalls bei Kleintieren aus Deutschland (2014) und Algerien (2016) [112, 114] sowie beim Geflügel im Libanon (2015) [107] und beim Rind in Ägypten (2016) [117]. Anders als in dieser Arbeit, in der wie in der Humanmedizin OXA-48 hauptsächlich bei *K. pneumoniae* nachgewiesen wurde, war in den meisten anderen Studien *E. coli* (i. d. R. Einzelisolate) Träger der Carbapenemase [107, 114, 117]. Außer in der Arbeit von Schmiedel *et al.* (2014), in der Proben unterschiedlicher Herkünfte untersucht wurden und OXA-48 bei *K. pneumoniae* und *E. cloacae* nachgewiesen werden konnte [112], wurden in den anderen Arbeiten Kotproben z. T. gezielt auf Carbapenemase-bildende *E. coli* untersucht und auch nur bei dieser Spezies gefunden [107, 114, 117]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus unterschiedlichen Herkünften und neben *E. coli* auch *K. pneumoniae* untersucht, was die Diskrepanz in den Berichten über OXA-48-tragende Spezies erklären kann. Trotz der vereinzelten Berichte über OXA-48-Nachweise in der Veterinärmedizin scheint die Verbreitung insgesamt noch sehr gering zu sein, da in mehreren Studien keine OXA-48-Bildner gefunden werden konnten [23, 118].

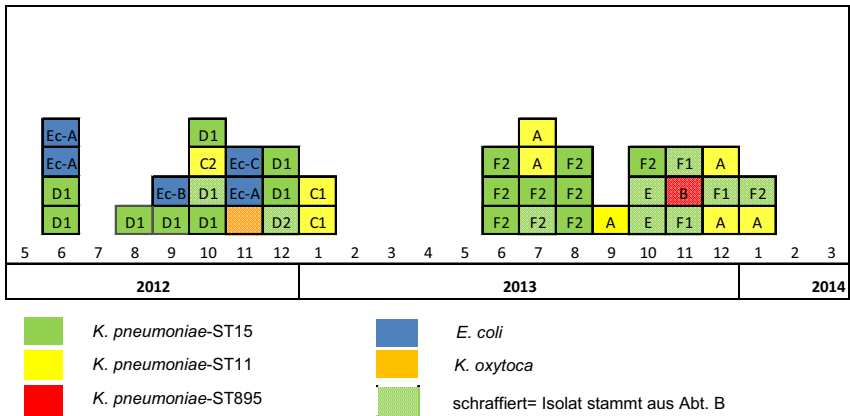
Bei zwei Hunden konnte jeweils ein OXA-48-bildendes *E. coli*- und ein OXA-48-bildendes *K. pneumoniae*-Isolat zeitgleich aus dem Probenmaterial (Wunde, BAL) isoliert werden. Eine *in vivo* Übertragung des OXA-48-Gens im Darm der Tiere, wie in der Humanmedizin von Göttig *et al.* (2015) beschrieben, wäre auch hier denkbar. Die Autoren konnten *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass das Gen von *K. pneumoniae*-Isolaten vom ST14 auf *E. coli*-Isolate vom ST666 übertragen wurde [352].

Alle OXA-48-bildenden *E. coli*- und vier OXA-48-bildende *K. pneumoniae*-Isolate zeigten bei der MHK-Bestimmung einen MHK-Wert für Imipenem von < 1 mg/L, womit sie nach CLSI als sensibel gegenüber diesem Wirkstoff eingestuft wurden (Tabelle 50) [236]. Eine reine MHK-Wert-Bestimmung von Imipenem wäre also bei diesen Isolaten nicht ausreichend gewesen um sie als Carbapenemase-Bildner zu identifizieren. Diese phänotypische Variabilität von

OXA-48 in Bezug auf die Empfindlichkeit und die im Allgemeinen geringe hydrolytische Aktivität gegenüber Carbapenemen, die auch in der Humanmedizin besonders für *E. coli* beschrieben wurde, stellt eine Schwierigkeit in der Detektion dar und kann dazu führen, dass OXA-48-Bildner bei rein phänotypischen Screenings unentdeckt bleiben [97, 353].

### **3.2 Hinweise auf eine nosokomiale Ausbreitung von Carbapenemase-produzierenden *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten**

Der wiederholte Nachweis von OXA-48-Isolaten aus derselben Klinik legte die Vermutung nahe, dass es sich um eine NI handeln könnte. Von einem nosokomialen Ausbruch kann gemäß §6 Abs. 3 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) dann gesprochen werden, wenn bei zwei oder mehr Patienten Infektionen, bei denen ein epidemischer Zusammenhang vorhanden oder wahrscheinlich ist, auftreten (§6 Abs. 3 IfSG, RKI). Eine NI ist definiert als eine Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionsanzeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder ambulanten medizinischen Maßnahme steht und nicht bereits vor dem Beginn dieser Maßnahme bestanden hat (§2 IfSG, RKI). Diese Definition ist auch auf den Bereich der Veterinärmedizin übertragbar, wo keine spezifische Definition existiert. Da für die in dieser Arbeit betroffenen Tiere aufgrund des fehlenden Screenings auf Carbapenemase-Bildner bei Aufnahme in die Klinik die Besiedlung mit OXA-48-Bildnern vor Beginn der Maßnahmen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, handelt es sich bei der Vermutung, dass eine NI vorliegt, um eine Hypothese. Diese begründet sich größtenteils darauf, dass die OXA-48-positiven Isolate in einem zeitlichen und räumlichen Zusammenhang zueinander standen (Abbildung 21). Sie konnten alle in einem definierten Zeitraum (Juni 2012-Februar 2014) aus Proben, die aus derselben Klinik für Kleintiere stammten, isoliert werden. In Abbildung 21 ist das zeitliche Vorkommen (angegeben in Monat/Jahr) der OXA-48-bildenden Isolate dargestellt.



**Abbildung 21: Zeitstrahl zu dem Vorkommen der OXA-48-bildenden *Klebsiella* spp.- (n=36) und *E. coli*-Isolate (n=5)**

Jedes abgebildete Kästchen steht für ein OXA-48-positives Isolat, die Einfärbung steht für die entsprechende Spezies und im Fall von *K. pneumoniae* für den jeweiligen ST. Die Beschriftung entspricht der jeweiligen Zuordnung des Isolats zum entsprechenden PFGE-Typ (s. dazu 3.3.2).

Die besagte Klinik ist in zwei Abteilungen, die unterschiedliche Schwerpunkte behandeln, unterteilt. In der Abteilung A (Abt. A) befindet sich die Innere Medizin mit angegliederter Intensivtherapiestation (ITS), die Abt. B beinhaltet den chirurgischen Bereich mit angegliederter Bildgebung. Siebzehn OXA-48-positive *Klebsiella* spp.-Isolate stammten aus der Abt. A, die übrigen neunzehn aus der Abt. B (in Abbildung 21 schraffiert dargestellt). Die fünf OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolate konnten allesamt von Tieren, die sich in der Abt. A in Behandlung befanden, isoliert werden.

Die Zeitpunkte der Isolierungen lagen zum Teil sehr nah beieinander. So wurden die bereits oben erwähnten Proben von zwei unterschiedlichen Hunden, in denen jeweils ein OXA-48-produzierendes *E. coli*- und ein *K. pneumoniae*-Isolat identifiziert werden konnten, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur mikrobiologischen Untersuchung an das IHIT in Auftrag gegeben. Auch andere OXA-48-positive Proben wurden im Abstand von wenigen Tagen entnommen. Die längste Zeitspanne, in der innerhalb des oben angegebenen Zeitraums keine OXA-48-Bildner nachgewiesen werden konnten, betrug vier Monate (Februar 2013-Mai 2013, Abbildung 21), obwohl die gleiche durchschnittliche Probenmenge und Probenart aus der Tierklinik in das diagnostische Labor eingesendet wurde.

Aufgrund der räumlichen und zeitlichen Nähe der isolierten OXA-48-Bildner lag die Vermutung nahe, dass diese in einem epidemiologischen Zusammenhang stehen könnten. Um Aussagen über die genetische Verwandtschaft der Isolate treffen zu können, wurde der ST mittels MLST bestimmt. Die *K. pneumoniae*-Isolate konnten dem ST15 (n=25) und dem

ST11 (n=9) zugeordnet werden. Ein Isolat erwies sich als dem ST895, einer SLV des ST11, zugehörig. ST15-*K. pneumoniae*-Isolate sind weltweit bekannt als Träger von ESBL-Genen, v. a. von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> [216, 290], konnten in der Humanmedizin aber auch bereits als Träger von *bla*<sub>OXA-48</sub> und als Verursacher von NI identifiziert werden [219, 351, 354] (s. 5.2). Fünfzehn der 25 ST15-OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate aus dieser Arbeit besaßen zusätzlich die ESBL CTX-M-15, eine Kombination, die auch aus der Humanmedizin bekannt ist [14]. Der ST11 konnte bei Patienten mit OXA-48 aber auch mit anderen Carbapenemasen wie z. B. KPC-2 und VIM-1 in Verbindung gebracht werden [231, 233, 354, 355] (s. 5.2). Auch wenn sich alle OXA-48-*E. coli*- und vier (11,1 %) OXA-48-*K. pneumoniae*-Isolate in der MHK-Testung als sensibel gegenüber Imipenem verhielten, werden alle OXA-48-Bildner laut KRINKO-Empfehlung aufgrund des Nachweises der Carbapenemase als 4MRGN eingestuft [343].

In der Humanmedizin wird vom RKI dringend empfohlen, Patienten mit 4MRGN unabhängig von der Station, auf der sie untergebracht sind, zu isolieren [343]. Zudem wird empfohlen, die Basishygiene z. B. auf das Tragen eines langärmeligen Kittels bei Kontakt mit dem betroffenen Patienten, das Tragen von Handschuhen schon bei einem möglichen Kontakt zu Sekreten, Exkreten, Blut oder kontaminierten Oberflächen oder eine Zuordnung von Geräten zum Patienten während des Aufenthalts zu erweitern [343]. In der Veterinärmedizin hat der Fund von 3MRGN und vor allem von 4MRGN keine weiteren Konsequenzen, da für diesen Bereich keine gesetzlichen Vorgaben oder Empfehlungen existieren und es an Fachpersonal z. B. in Form eines Hygienebeauftragten, der die Maßnahmen durchführen und überwachen kann, mangelt. Zudem sind die bisherigen Funde zumindest von 4MRGN zufällig und selten, weswegen hier möglicherweise noch nicht die Notwendigkeit gesehen wird, adäquat zu reagieren.

Die zur weiteren Aufklärung eines eventuellen nosokomialen Geschehens durchgeführte Makrorestriktionsanalyse zeigte, dass tatsächlich einige Isolate innerhalb der jeweiligen Sequenztypen identisch oder sehr nah miteinander verwandt waren (Auswertungskriterien nach Tenover *et al.*, s. 2.3.4.3). Die Verteilung der PFGE-Typen auf die beiden Klinikabteilungen zeigt, dass acht der neun ST11-OXA-48-*K. pneumoniae*-Isolate und auch das ST895-OXA-48-*K. pneumoniae*-Isolat der Abt. B entstammten, was auf eine Ausbreitung dieses Klon v. a. in dieser Abteilung hindeutet. In retrospektiven Untersuchungen (s. dazu auch 3.3) konnte gezeigt werden, dass der ST11 deutlich später auftrat als der ST15, was dafür sprechen könnte, dass er sich bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht im gleichen Ausmaß in der Klinik ausbreiten konnte wie der ST15. Der Hund, von dem das einzige ST11-OXA-48-Isolat aus der Abt. A stammt, hielt sich nachweislich an zwei Tagen zwecks bildgebender Verfahren in der Abt. B auf, was auf eine mögliche Infektionsquelle in diesem Bereich hinweisen könnte.



Insgesamt gibt es viele Schnittpunkte zwischen den beiden Abteilungen der Klinik, was einen Austausch und eine Verbreitung der Carbapenemase-produzierenden Enterobacteriaceae begünstigen könnte. Operationen finden nur in der Abt. B statt, in der Abt. A befindet sich die ITS, die auch für die Versorgung und Überwachung der chirurgischen Patienten aus der Abt. B zuständig ist. Des Weiteren gehen Patienten aus der Abt. B zur dermatologischen und kardiologischen Abklärung in die Abt. A, Patienten aus der Abt. A für die Durchführung von bildgebenden Verfahren in die Abt. B.

Für die meisten Hunde und auch für die beiden Katzen, von denen OXA-48-Bildner isoliert werden konnten, konnte nachweislich ein Überschneidungspunkt mit der jeweils anderen Abteilung festgestellt werden. Zum Teil befanden sich Patienten, die OXA-48-positiv getestet wurden, zum gleichen Zeitpunkt in derselben Abteilung und Räumlichkeit. Eine Verbreitung der OXA-48-Klone zwischen den beiden Abteilungen der Klinik ist also möglich und auch sehr wahrscheinlich. Da in der Humanmedizin in ITS eine hohe Rate von NI beobachtet wird und auch in der Veterinärmedizin bereits über NI, die ihren Ursprung in ITS haben, berichtet wurde, muss die ITS als eine der möglichen Quellen in Betracht gezogen werden [170, 356]. Zwölf der 31 betroffenen Hunde hielten sich während ihres Klinikaufenthalts nachweislich zumindest für wenige Tage auf der ITS auf, einige wurden anschließend auf die Normalstation verlegt, was mitunter für die Verbreitung der OXA-48-Bildner verantwortlich sein könnte. Patienten aus der Abt. B, die chirurgisch versorgt wurden und zur Stabilisierung anschließend auf die ITS verlegt wurden, könnten den Ausgangspunkt für einen Transfer in die Abt. B darstellen. Um das gesamte Ausmaß der Verbreitung der OXA-48-Klone in den Räumlichkeiten der beiden Abteilungen der Klinik zu überblicken und zu beurteilen, müssten Umgebungsproben aus jedem Raum und auch von jeder Person, die potentiell mit den Tieren in Kontakt steht, genommen werden. So könnten eventuelle Verbreitungswege besser nachvollzogen werden. Diese Untersuchungen waren nicht Teil dieser Arbeit, sie werden aber für einen Teilbereich der angesprochenen Klinikräume im Rahmen einer weiteren Arbeit durchgeführt.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen *E. coli*-Isolate konnten drei verschiedenen ST (ST1196, ST410, ST1431) zugeordnet werden, die bisher nicht als Träger von Carbapenemasen vom OXA-48-Typ bei Menschen beschrieben wurden. Der ST410 wurde aber z. B. bereits mit der Carbapenemase NDM-1 bei Patienten aus Kanada, die vorberichtlich größtenteils einen Aufenthalt in Indien vorweisen konnten, assoziiert [357]. Besonders *E. coli* vom ST38 oder auch vom ST405, ST131 und ST648 wurden bisher häufiger als Träger von OXA-48 beschrieben [113, 209, 211] (s. 5.1). Insgesamt betrachtet scheint die Verbreitung von OXA-48 bei *E. coli* nicht wie bei *K. pneumoniae* mit bestimmten Klonen assoziiert zu sein, sondern vielmehr mit verschiedenen Genotypen. Diese Tatsache würde möglicherweise für einen starken Transfer des OXA-48-Plasmids innerhalb der *E. coli*-Population sprechen. Zudem wird *E. coli* insge-

samt seltener als *K. pneumoniae* als Hospitalkeim beschrieben, was u. a. mit der Tenazität des Erregers in Verbindung gebracht wird. Faktoren wie die Kapsel, die vor Austrocknung schützen kann, oder Fimbrien, die eine Biofilmbildung möglich machen, können das Überleben in der Klinikumgebung erleichtern und stellen wichtige Virulenzfaktoren bei *K. pneumoniae* dar [6]. Darüber hinaus befindet sich das natürliche Habitat von *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* neben der Schleimhaut von Säugetieren auch in der Umwelt. Im Unterschied dazu kommen Vertreter der Spezies *E. coli* üblicherweise nicht bzw. nur sporadisch in der Umwelt vor [31, 171]. An eine Existenz außerhalb des Säugetierwirts ist *E. coli* möglicherweise nicht so gut angepasst wie Vertreter der Gattung *Klebsiella*. Die fünf *E. coli*-Isolate konnten im Zeitraum von Juni bis November 2012, jedoch nicht mehr in dem restlichen Untersuchungszeitraum von Dezember 2012 bis Juni 2013 nachgewiesen werden. Die möglicherweise schlechtere Anpassung von *E. coli* an die Klinikumgebung wäre eine Erklärung für die kurze Zeitspanne des Nachweises der OXA-48-positiven *E. coli*-Isolate. Da auch in der Humanmedizin die Übertragbarkeit von *K. pneumoniae* bei invasiven Maßnahmen beschrieben wurde [358, 359], müssten gezielte Beprobungen von z. B. Tuben, Instrumenten, etc. durchgeführt werden, um zu zeigen, ob *Klebsiella* spp. in diesen Bereichen häufiger vorhanden sind als *E. coli*. Insgesamt lässt sich festhalten, dass *K. pneumoniae*, wie in der Humanmedizin beschrieben [358], im Kleintierbereich mehr Tendenzen zur Ausbreitung in klinischen Einrichtungen aufweisen als *E. coli*.

### 3.3 Ursprung der OXA-48-Bildner – exogen vs. endogen

Die Entstehung einer NI ist i. d. R. multifaktoriell bedingt. Es spielen nicht nur Faktoren wie Alter, Ernährungszustand des Patienten, Immunkompetenz und auch das Vorliegen von (chronischen) Erkrankungen eine wichtige Rolle, sondern auch exogene Faktoren wie längerfristige Antibiotikatherapie, das Vorhandensein von Dauerkathetern, die Gabe von Immunsuppressiva oder invasive Manipulationen wie Intubation oder Endoskopie [358]. Sowohl die endogene als auch eine exogene Mikrobiota können Ursache einer NI sein. Infolge von Immunschwäche des Patienten und dem Selektionsdruck durch erfolgte Antibiotikagabe ist es den sonst in harmloser Co-Existenz lebenden endogenen Bakterien möglich, die natürliche Schutzbarriere des Patienten zu durchbrechen und Infektionen zu verursachen. Eine Infektion mit exogenen Erregern kann häufig mit mangelnder Hygiene des behandelnden Personals, das heißt durch fehlende oder unzureichende Desinfektionsmaßnahmen der Hände zwischen der Behandlung von zwei Patienten oder unzureichender Desinfektion von Behandlungstischen, Instrumentarien, etc., in Verbindung gebracht werden [358]. Carbapeneme sind nicht für den Gebrauch in der Veterinärmedizin zugelassen und ein Einsatz darf in der Kleintiermedizin nur unter bestimmten Voraussetzungen nach Umwidmung erfolgen. Dennoch kann auch der Einsatz von Penicillinen oder Cephalosporinen OXA-48-Bildner se-

lektieren, da diese in der Lage sind, Penicilline und z. T. auch Cephalosporine zu verstoffwechseln [352, 360]. Das bedeutet, dass auch nach der Gabe von Penicillinen oder Cephalosporinen die kommensale Mikrobiota durch den Einsatz der genannten Antibiotika entsprechende Resistenzmechanismen ausgebildet haben könnte. Zudem wäre es denkbar, dass der Besitz des OXA-48-Plasmids dem Bakterium neben der Resistenz weitere Selektionsvorteile verschafft (s. 3.5). Aufgrund der Ergebnisse von anderen Studien, in denen von Infektionen durch die eigene Mikrobiota vor allem bei immunsupprimierten Individuen berichtet wurde, wäre auch in diesem Fall eine Infektion der Tiere über ihre eigene endogene Mikrobiota denkbar [361]. Über eine bereits bestehende Besiedlung der betroffenen Tiere bei Aufnahme in die Klinik kann jedoch keine Aussage getroffen werden, da, wie bereits erwähnt, kein Screening auf Carbapenemase-Bildner stattfindet. In einer unabhängigen Arbeit, in der Oberflächen und Geräte der ITS derselben o.g. Klinik beprobt und auf multiresistente Erreger untersucht wurden, konnte ein identisches OXA-48-positives *K. pneumoniae*-Isolat vom ST15 auf dem Boden des Kontrollraums der ITS gefunden werden (Bovermann *et al.*, unveröffentlicht). Auch der oben erwähnte Nachweis eines OXA-48-produzierenden *E. coli*-Isolats im Kot eines Hundes im Rahmen einer medizinischen Nachkontrolle (*E. coli*-Isolat 3), bei dem in anderen Proben kein OXA-48-Bildner gefunden wurde, spricht mehr für die Möglichkeit der Kolonisation und einer weiteren Verbreitung über dadurch kontaminierte Oberflächen, Gegenstände oder auch Hände des Klinikpersonals als für Infektionen durch die eigene endogene Mikrobiota.

Bei nosokomialen Ausbrüchen bei Tieren mit anderen multiresistenten Erregern wurden Menschen als Ursache für die Kolonisation bzw. Infektion in Betracht gezogen. So vermuteten Zordan *et al.*, dass als Ursache für ein endemisches Geschehen, bei dem über einen Zeitraum von 9 Jahren z. T. nah verwandte, multiresistente *A. baumannii* aus drei verschiedenen Tierkliniken der JLU Gießen nachgewiesen werden konnten, neben einer Tier-Tier-Übertragung auch eine Übertragung über kontaminierte Hände oder Equipment zu der Verbreitung des Klon in Frage kommen könnte [362]. Bei einem nosokomialen Ausbruch mit MRSA in einer Kleintierklinik, bei dem bei mehreren Hunden eine Kolonisation mit demselben Klon festgestellt werden konnte, wurden ebenfalls Menschen als Überträger diskutiert, da die Hunde untereinander keinen oder nur minimalen Kontakt hatten und eine Übertragung auf diesem Weg nahezu ausgeschlossen werden konnte [356].

Am häufigsten konnten die OXA-48-Bildner in dieser Arbeit aus Urin (n=15) und Wunden (n=11) isoliert werden. Die anderen Isolate stammten aus dem Abdomen (n=4), aus zentralen Venenkathetern (n=3), aus dem Respirationstrakt (n=3), von der Haut (n=2) und jeweils ein OXA-48-bildendes Isolat stammte aus einer Blutkultur, Kot und einer Ösophagussonde. Diese Beobachtungen decken sich mit Berichten aus der Humanmedizin, in denen OXA-48-Bildner ebenfalls häufig aus Urin, Wunden und Proben aus dem Respirationstrakt identifiziert

werden konnten [13, 96, 351, 354]. Invasive Behandlungen wie das Legen eines Blasenkateters oder eines Trachealtubus begünstigen die Entstehung einer NI [363]. Sie stellen somit einen Risikofaktor dar und sind eine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten multi-resistenter Bakterien in den betroffenen Lokalisationen. Harnwegsinfektionen und Sepsis, zwei der wichtigsten NI, werden in der Humanmedizin und auch in der Veterinärmedizin oftmals mit der Anwendung von Harnwegs- oder Venenkathetern assoziiert [363-365]. Es existieren zudem mehrere Berichte aus der Humanmedizin, in denen ESBL- und Carbapenemase-Bildner z. B. über eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie, eine Duodenoskopie oder eine Endoskopie übertragen wurden [359, 366-368]. Auch in der Veterinärmedizin wurde bereits von einer Übertragung einer NI bedingt durch ESBL-/AmpC-Bildner über kontaminierte Venenkatheter berichtet [369]. Auffällig ist, dass nur zwei der 41 OXA-48-Bildner von Katzen isoliert werden konnten. Neben der Möglichkeit, dass insgesamt weniger Katzen als Hunde in der Klinik behandelt werden, könnte eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz die meist weniger invasive Behandlung von Katzen sein [370]. Die beiden Katzen wurden aufgrund von Verletzungen mehrmals operiert, weswegen davon auszugehen ist, dass beiden ein venöser Zugang gelegt wurde. Um zu überprüfen, ob Katheter möglicherweise an der Verbreitung der OXA-48-Bildner beteiligt sind, wird derzeit in einer Folgestudie eine vermehrte Anzahl an Kathetern aus der besagten Klinik auf ESBL-/Carbapenemase-Bildner untersucht.

Die Frage nach dem eigentlichen Ursprung der OXA-48-Bildner konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. In der Humanmedizin hat sich der Einsatz von Carbapenemen in den letzten Jahren stark erhöht, was bedeutet, dass Menschen sehr viel öfter mit Carbapenemen in Berührung kommen als Tiere [371]. Das bei allen Isolaten der vorliegenden Arbeit nachgewiesene OXA-48-Plasmid ist in Bezug auf Übertragbarkeit, Größe und Plasmidreplikontyp den humanen OXA-48-Plasmiden sehr ähnlich. Somit käme die Möglichkeit des humanen Eintrags dieses Plasmids, beispielsweise durch Mitarbeiter der Klinik oder durch Patientenbesitzer, die mit *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragenden Enterobacteriaceae infiziert oder symptomlos kolonisiert waren, in Betracht. Weiterführende Untersuchungen wie ein Screening des angestellten Klinikpersonals auf eine Besiedlung mit OXA-48-bildenden Enterobacteriaceae oder eine Befragung zu früheren Krankenhausaufenthalten oder Infektionen waren innerhalb dieser Arbeit nicht möglich. Aufgrund des teilweise sehr engen Kontakts zwischen Tierbesitzer und Haustier kommen auch Tierbesitzer als Infektionsquelle in Betracht. Die Übertragung kann möglicherweise bereits in der häuslichen Umgebung stattgefunden haben, ein folgen der Aufenthalt des Tieres in der Klinik kann dann zu einem Eintrag geführt haben. Diesen Weg nachzuvollziehen bzw. den betroffenen Patienten/Tierbesitzer ausfindig zu machen, war bei dem gewählten Studiendesign nicht möglich.

In einer im Anschluss an diese Arbeit durchgeführten retrospektiven Studie (unveröffentlichte Daten) konnte das Vorkommen der ST15-OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate in der betroffenen Tierklinik bis in das Jahr 2009 zurückverfolgt werden. Die ST11-*K. pneumoniae*-Isolate traten erstmals 2011 und die OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolate im März 2012 auf. Ein interspezies-Transfer eines OXA-Plasmids, wie auch in der Humanmedizin bereits beschrieben, wäre aufgrund des zeitlich versetzten Auftretens sowohl bei den OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolaten als auch bei den ST11-OXA-48-*K. pneumoniae*-Isolaten, die eventuell bereits ohne OXA-48-Plasmid in der Klinik zirkulierten, denkbar [372]. Seit wann der ST15-OXA-48-*K. pneumoniae*-Klon bereits in der Klinik zirkuliert, kann nicht näher bestimmt werden, da aus der Zeit vor August 2009 keine Isolate zur weiteren Untersuchung vorhanden waren. Eine weitere Möglichkeit wäre der im gesamten Zeitraum wiederholte Eintrag von OXA-48-positiven Spezies und Sequenztypen von verschiedenen Patienten mit einer sich jeweils anschließenden klonalen Verbreitung in der Klinik. Da es sich hier jedoch um den ersten Bericht über den Nachweis OXA-48-positiver Enterobacteriaceae bei Hobbytieren handelt und es insgesamt bisher nur wenige vereinzelte Berichte über OXA-48- Bildner bei Tieren gibt, erscheint diese Möglichkeit recht unwahrscheinlich.

### 3.4 OXA-48-Bildner bei Tieren – Infektion vs. Kolonisation

Während bei den meisten Patienten in der Humanmedizin eine Infektion mit Carbapenemase-Bildnern auch aufgrund der fehlenden Therapieoptionen oftmals schwerwiegend verläuft, ist ein Teil der Patienten oftmals nur kolonisiert, das bedeutet, die Erreger können nachgewiesen werden, stehen aber nicht in einem Zusammenhang mit einer klinischen Symptomatik [14, 97, 351]. Da humane Patienten Studien zufolge im Durchschnitt 278 Tage mit OXA-48-bildenden *K. pneumoniae*- und 225 Tage mit OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolaten kolonisiert bleiben und diese Kolonisierung oft unbemerkt bleibt, tragen diese Patienten einen nicht unerheblichen Teil zur Ausbreitung der OXA-48-Bildner sowohl in aber auch außerhalb der Klinik im Anschluss an den Aufenthalt bei [353]. Auch in dieser Arbeit muss davon ausgegangen werden, dass einige der betroffenen Tiere lediglich mit OXA-48-Bildnern kolonisiert waren. In vielen Fällen konnten neben den OXA-48-produzierenden Isolaten weitere (fakultativ) pathogene Erreger aus dem Probenmaterial isoliert werden (z. B. *A. baumannii*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp.), so dass die OXA-48-bildenden Bakterien nicht eindeutig als Ursache der Infektion zu identifizieren waren. Zudem konnten OXA-48-positive Isolate häufig in Spülproben oder Spitzen von zentralen Venenkathetern gefunden werden, deren Untersuchung laut Angaben von Tierärzten der Klinik in den meisten Fällen zur Überprüfung einer eventuell vorliegenden Kontamination und nicht aufgrund einer klinischen Symptomatik in Auftrag gegeben wurde. In fünf Fällen, in denen OXA-48-bildende *K. pneumoniae*-Isolate im Urin in Reinkultur nachgewiesen werden konnten und vorberichtet-

lich eine klinische Symptomatik der Zystitis genannt wurde, die jedoch noch nicht bei Aufnahme in die Klinik bestanden hat, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine NI im Sinne des §2 des IfSG handelt.

In anderen Fällen, in denen bisher Carbapenemasen bei Enterobacteriaceae von Tieren nachgewiesen werden konnten, ist meist eher von einer Kolonisation als von einer Infektion auszugehen, da der Nachweis in den meisten Fällen aus Kotproben gesunder LM-liefernder Tiere im Rahmen von nationalen Screeningprogrammen erfolgte [22, 25, 107, 111] (s. auch 2.3.2.2). Die von Shaheen *et al.* in den USA beschriebenen *bla*<sub>NDM</sub>-positiven *E. coli*-Isolate von Hobbytieren wurden in klinischem Probenmaterial (4x Urin, jeweils 1x Nase und Wunde) nachgewiesen. Allerdings wurden die eventuell zusätzlich nachgewiesenen Begleitkeime ebenso wenig beschrieben wie die klinische Symptomatik, sodass die Frage nach einer Kolonisation oder Infektion nicht beantwortet werden kann [23]. Auch für die Carbapenemase-produzierenden *Acinetobacter* spp., die bisher bei Tieren gefunden werden konnten, wurde meistens kein Zusammenhang zu einer klinischen Erkrankung hergestellt [101-103, 105]. Nur in zwei Fällen konnte jeweils ein OXA-23-produzierendes *A. baumannii*-Isolat in Reinkultur aus dem Urin von Katzen, die vorberichtlich an Zystitis litten, isoliert werden, womit dem Erreger eine klinische Relevanz attestiert werden konnte [106, 110].

Nosokomiale Ausbrüche mit anderen Bakterien wie MRSA oder ESBL wurden in der Vergangenheit bereits häufiger beobachtet. Auch hier konnte oftmals eine reine Kolonisation bei allen betroffenen Tieren festgestellt werden, in einigen Fällen zeigten sich jedoch auch Infektionen, für die als Ursache die Kolonisation von Klinikpersonal und anderen stationär aufgenommenen Tieren in Frage kommen könnte [356, 373]. Walther *et al.* konnten in ihrer Studie Hinweise auf eine nosokomiale Verbreitung ESBL-bildender *E. coli*-Isolate in einer Pferdeklinik finden [374]. Drei Pferde, die innerhalb von 12 Tagen in derselben Klinik einer Kolik-Operation unterzogen wurden, entwickelten eine Wundinfektion und konnten an dieser Lokalisation positiv für ESBL-bildende *E. coli* des gleichen PFGE-Typs getestet werden [374]. Diese Beispiele zeigen, dass ESBL-/Carbapenemase-bildende Bakterien neben einer reinen Kolonisation durchaus als Ursache für NI in der Tiermedizin in Frage kommen.

Auch wenn Carbapenemase-produzierende Bakterien bei Tieren bisher eher als Kolonisierer aufzutreten scheinen und nur in einzelnen Fällen ein klarer Bezug zur Klinik gezogen werden konnte (s. 2.3.2.2), zeigen diese und auch die Arbeiten von Pomba *et al.* und Ewers *et al.*, dass derartige Erreger auch in der Veterinärmedizin an Bedeutung zunehmen könnten. Dies ist neben fehlenden therapeutischen Optionen v. a. im Hinblick auf eine globale Verbreitung dieser Erreger bzw. ihrer Resistenzdeterminanten sowie dem damit verbundenen Zoonoserisiko möglicherweise von großer Bedeutung für die „Public Health“.

### 3.5 Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung von *E. coli* und *K. pneumoniae*

In einer humanmedizinischen Studie, die den Ausbruch mit OXA-48-bildenden Enterobacteriaceae in einem niederländischen Krankenhaus zwischen 2009 und 2011 näher untersuchte, konnte gezeigt werden, dass ein in der Klinik zirkulierender ESBL-produzierender *K. pneumoniae*-Klon das OXA-48-Plasmid aufnehmen konnte, als es von extern in die Klinik eingetragen wurde [97]. Dieser Vorgang wäre auch für die OXA-48-Bildner aus dieser Arbeit denkbar. So besaßen viele der OXA-48-positiven *K. pneumoniae*- und *E. coli*-Isolate zusätzlich die ESBL CTX-M-15, die oftmals auch in Isolaten aus der o. g. Klinik ohne das zusätzliche Vorhandensein eines OXA-Plasmids identifiziert werden konnte. Faktoren, die eine Aufnahme und den Verbleib des OXA-48-Plasmids begünstigen, sind derzeit noch Gegenstand der Forschung. Der Vorgang einer Co-Selektion kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Sequenzanalyse von OXA-48-Plasmiden mit gleicher Größe gezeigt hat, dass keine weiteren Resistenzgene auf dem Plasmid lokalisiert sind [375, 376]. Es wird allgemein angenommen, dass ein verminderter Einsatz von Antibiotika zur Verringerung des Auftretens resistenter Bakterien führen kann, da anzunehmen ist, dass das Vorhandensein einer Resistenz in der Regel mit einem Fitnessverlust für das Bakterium einhergeht [377]. Durch Wegfall des Selektionsdrucks hätten Antibiotika-sensible Stämme so im Vergleich zu resistenten Stämmen einen Fitnessvorteil und wären in der Lage, diese zu verdrängen. Es konnte jedoch bereits in einigen Studien beschrieben werden, dass Resistenzgene (u. a. *bla*<sub>CTX-M-14</sub> und Tetracyclinresistenzgene) trotz fehlenden Antibiotikaselektionsdrucks in der Lage waren *in vitro* und *in vivo* bis zu 2,5 Jahren zu persistieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Übertragungsrate *in vitro* von Resistenzplasmiden zwischen Donor und Empfänger in Abwesenheit von Antibiotika höher war als in Anwesenheit [377, 378]. Deshalb besteht die Vermutung, dass Resistenzplasmide und eventuell auch OXA-48-Plasmide den Bakterien einen anderen Fitness- bzw. Selektionsvorteil verschaffen, der die Persistenz und Zirkulation in der Klinik begünstigt. Dazu können eine verbesserte Biofilmbildung, eine erhöhte Serumresistenz oder eine verbesserte Invasionsfähigkeit zählen [379]. Da bekannt ist, dass besonders *Klebsiella* spp. eine hohe Tenazität und die Tendenz zur Biofilmbildung besitzen (s. 4.2), sollte in dieser Arbeit der mögliche Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung in zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass auf dem Spanagar alle untersuchten WT-OXA-48-*K. pneumoniae*-Isolate im Gegensatz zu ihren TK weder bei 28°C noch bei 37°C eine Biofilmbildung zeigten. Der *E. coli*-K-12-Stamm J53, der bei der Transkonjugation als Empfängerstamm diente, zeigte ebenfalls eine Biofilmbildung auf dem Spanagar, die jedoch nicht so deutlich ausgeprägt war, wie die der TK. Es ist somit zumindest von einer deutlicheren Ausprägung des Vorgangs der Biofilmbildung

durch Empfang des OXA-48-Plasmids auszugehen. Anders verhielt es sich hingegen bei den OXA-48-bildenden *E. coli*-Isolaten. Alle WT zeigten eine Biofilmbildung auf dem Spanagar bei 28°C, wohingegen bei den TK sowohl eine Abschwächung als auch eine Verstärkung der Biofilmbildung im Vergleich zu der schwachen Biofilmbildung des *E. coli* J53 zu beobachten war. Der Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung der PCV auf dem Spanagar unterstreicht den möglichen Einfluss des Plasmids auf diesen Phänotyp. Die Beobachtungen decken sich mit denen von Shin *et al.* (2015), nach denen die Resistenzplasmide auf verschiedene Spezies einen unterschiedlichen Einfluss besitzen und zu anderen Ergebnissen führen könnten [380]. Die Autoren konnten nachweisen, dass *K. pneumoniae*-TK vom ST11, die ein CTX-M-15-tragendes Plasmid aufgenommen haben, im Vergleich zu ihren ST11-CTX-M-15-WT eine höhere Serumresistenz besitzen [381]. In einer sich anschließenden Studie, in der die Effekte von CTX-M-14- und CTX-M-15-Plasmiden auf die Virulenz und Fitness von ST131-*E. coli*-Isolaten untersucht wurden, konnte hingegen festgestellt werden, dass wiederum Non-CTX-M-Typ-*E. coli* eine höhere Serumresistenz und verbesserte Biofilmbildung besaßen als die Isolate mit einem CTX-M-14- oder CTX-M-15-Plasmid. Die Unterschiede zwischen den beiden Studien erklären die Autoren mit einer möglichen unterschiedlichen Auswirkung der ESBL-Plasmide auf die verschiedenen Bakterienspezies [380]. Möglicherweise trifft das auch für verschiedene Sequenztypen innerhalb einer Spezies zu.

Die Ergebnisse des KV-MTP-Tests decken sich weitestgehend nicht mit den Ergebnissen der Biofilmbildung auf dem Spanagar. Bis auf einzelne Abweichungen wird deutlich, dass im KV-MTP-Test die PCV der OXA-48-Bildner eine verbesserte Biofilmbildung aufweisen als ihre WT. Dazu passt, dass bei dem überwiegenden Teil die TK im Vergleich zum Empfängerstamm *E. coli* J53 eine deutlich geringere Biofilmbildung zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das OXA-48-Plasmid die Biofilmbildung also eher zu hemmen als zu verstärken. In einer anderen Studie wurden gegenteilige Ergebnisse genannt. So konnten bei CMY-16- und TEM-92-bildenden *P. mirabilis*-Isolaten eine signifikant erhöhte Biofilmbildung beobachtet werden. Es muss jedoch die geringe Anzahl getesteter Isolate beachtet werden und die Tatsache, dass keine TK und PCV der entsprechenden Wildtypen generiert und zum Vergleich untersucht wurden, sondern *P. mirabilis*-Stämme, die keine der untersuchten  $\beta$ -Laktamase-Gene besaßen, was die Aussagekraft dieser Studie erheblich mindert [382]. In einer anderen Studie, in der unter Biofilm-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten vom Menschen nach ESBL-Bildnern geschaut wurde, konnte ein signifikant höherer Anteil an ESBL-Bildnern ausgemacht werden [383]. In einer Arbeit von Schaufler *et al.* (2016), in denen ESBL-bildende WT-*E. coli*, deren TK und PCV ebenfalls dem KV-MTP-Test unterzogen wurden, konnten zumindest für die Biofilmbildung in LB-Medium ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit erzielt werden. Als Erklärung für die Biofilmbildung der PCV bei gleichzeitig fehlender Biofilmbildung der WT wurde vermutet, dass die planktonisch lebenden



WT in dem nährstoffreichen LB-Medium nicht gezwungen waren, einen Biofilm zur verbesserten Nährstoffaufnahme zu bilden [384]. Anders als in der Arbeit von Schaufler *et al.* konnte in dieser Arbeit jedoch auch im M63-Medium keine erhöhte Biofilmbildung des WT gegenüber seiner PCV beobachtet werden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit keine übereinstimmenden Ergebnisse zum Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung gefunden werden. Eine Verbesserung der Fitness in Bezug auf die Biofilmbildung durch das OXA-48-Plasmid konnte mit den gewählten Methoden nicht bestätigt werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Testverfahren (Spanagar und KV-MTP-Test) lassen sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Nährmedien und deren Beeinflussung auf die Biofilmbildung der einzelnen Bakterien zurückführen. Zudem wurden zwei verschiedene Spezies und dabei jeweils verschiedene Sequenztypen in die Untersuchungen mit einbezogen, was ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte. Auch eignen sich die Untersuchungsmethoden nicht dafür, Rückschlüsse auf die Vorgänge *in vivo* zu ziehen, die sich möglicherweise ganz anders darstellen würden. Schaufler *et al.* konnten in ihrer Arbeit (2016) zeigen, dass bei ESBL-bildenden WT-*E. coli*-Isolaten und den dazugehörigen TK Gene, die für Curli Fimbrien und Cellulose-Bildung kodieren, im Vergleich zu ihren PCV hochreguliert sind [384]. In weiterführenden Untersuchungen müssten also auch bei den Isolaten aus dieser Arbeit chromosomale Gene, die an der Biofilmbildung beteiligt sind und deren Grad der Expression in den WT und PCV vergleichend untersucht werden, um weiterführende Aussagen zum Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung treffen zu können. Zugleich müssten bei TK, die auf dem Spanagar eine deutlich höhere Biofilmbildung als ihre WT zeigten, geprüft werden, welche Gene, die ebenfalls auf dem Resistenzplasmid lokalisiert sind, für die positive Beeinflussung der Biofilmbildung verantwortlich sein könnten.

## VI Zusammenfassung

Die weltweite Ausbreitung von Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL)- und Carbanemase (CP)-bildenden Enterobacteriaceae gilt derzeit als eine der größten Herausforderungen für das öffentliche Gesundheitswesen. Tiere werden vielfach als Quelle von ESBL-Bildnern beschrieben, während ihre Bedeutung als Träger und Überträger von CP-bildenden Bakterien weitestgehend unerforscht ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ESBL-/CP-bildende *Escherichia coli* (*Ec*)- und *Klebsiella* (*K.*) spp.-Isolate von Hobby- und Nutztieren (Rind/Schwein) zu charakterisieren. Für einen Vergleich mit den bei Menschen beschriebenen Resistenztypen und internationalen Klonen wurden die ESBL-/CP-Varianten und *EciK. pneumoniae* (*Kp*)-Sequenztypen bestimmt. Die Analyse der bei extraintestinal pathogenen *Ec* (ExPEC) und intestinal pathogenen *Ec* beschriebenen virulenzassoziierten Genen (VAGs) diente der Zuordnung der *Ec*-Isolate zu Pathotypen. Schließlich wurde überprüft, inwieweit ein Resistenzplasmid die Biofilmbildung der Bakterien beeinflusst.

Im Zeitraum von Juni 2012 bis Februar 2014 wurden 3582 *Ec*-, 457 *Kp*- und 132 *K. oxytoca* (*Ko*)-Isolate von überwiegend kranken Nutz- und Hobbytieren aus bakteriologischem Untersuchungsgut von > 400 Tierarztpraxen/-kliniken untersucht. Es konnten 280 *Ec*-, 44 *Kp*- und 5 *Ko*-Isolate als ESBL-Bildner bestätigt werden, zudem wurden 38 bzw. 11 AmpC- $\beta$ -Laktamase (AmpC)-bildende *Ec*- und *Klebsiella* spp.-Isolate identifiziert. ESBL-/AmpC-bildende *Ec*-Isolate traten am häufigsten bei Rindern (17,4 %) und Hunden (11,1 %) auf. ESBL-bildende *Klebsiella* spp.-Isolate wurden am häufigsten bei Hunden (22,3 %) nachgewiesen, bei Nutztieren kamen sie deutlich seltener vor (Rind: 2,6 %, Schwein: 1,6 %). AmpC-bildende *Klebsiella* spp.-Isolate kamen nur beim Hund vor. Isolate aus Wunden, die ausnahmslos von Hobbytieren stammten, zeigten die höchste Rate an ESBL-/AmpC-Bildnern (*Ec*: 22,1 %, *Klebsiella* spp.: 60,0 %), gefolgt von Isolat aus Urin, Haut- und Haarproben sowie Kot.

Der häufigste ESBL-Typ bei *Ec* war CTX-M-1 (58,9 %), gefolgt von CTX-M-15 (23,9 %), CTX-M-14 (6,4 %) und weiteren Typen, wie SHV-12 (6,1 %) und CTX-M-3 (1,8 %). CTX-M-1 wurde vermehrt bei Nutztieren (Rind: 17 %, Schwein 52,7 %, Hund und Katze: 14,5 %), die bei Menschen weit verbreitete ESBL CTX-M-15 hingegen vermehrt bei Hobbytieren (Hund und Katze: 44,8 %, Rind: 16,4 %, Schwein: 14,9 %) nachgewiesen. SHV-12 trat fast ausschließlich bei Hobbytieren auf. Bei den ESBL-bildenden *Klebsiella* spp.-Isolaten dominierte CTX-M-15 (71,4 %). Die häufigste AmpC bei den *Ec*-Isolaten war CMY-2 (n=29); DHA-1 und ACC-4 konnten jeweils einmal nachgewiesen werden. Unter den *Klebsiella* spp.-Isolaten dominierte die AmpC DHA-1 (28 %). Für 12 der 38 AmpC-bildenden *Ec*-Isolate konnte eine Mutation im Bereich des AmpC-Promotors festgestellt werden, die eine Hyperproduktion von AmpC bedingt. Nahezu alle ESBL-/AmpC-bildenden *Klebsiella* spp.-Isolate sowie 21,7 % der

*Ec*-Isolate besaßen mindestens eines der Fluorchinolonresistenzgene *qnr*, *oqxA/B* und *aac(6')-Ib-cr*.

Acht (8,2 %, 8/97) ESBL-bildende intestinale *Ec*-Isolate von Schweinen wurden als enterotoxische *Ec* (ETEC), zwei als atypische enteropathogene *Ec* (aEPEC) identifiziert. Ein Großteil der ESBL-/AmpC-bildenden *Ec*-Isolate wurde den Phylogruppen A (41,5 %) und B1 (24,8 %) zugeordnet. Eine Eingruppierung in die eher ExPEC enthaltenden Gruppen B2, D und F gelang bei 43 (13,5 %) Isolaten. Diese konnten Sequenztypen zugeordnet werden (ST131, ST405, ST648), die maßgeblich an der globalen Ausbreitung von ESBL-Genen beim Menschen beteiligt sind. Der Nachweis zahlreicher ExPEC-assoziiierter VAGs lässt zudem auf ein mögliches pathogenes Potential dieser Isolate schließen. Auch bei den ESBL-bildenden *Kp*-Isolaten dominierte mit dem ST15 eine in der Humanmedizin weit verbreitete klonale Linie von großer klinischer Relevanz.

In dieser Arbeit konnten erstmals CP-bildende Enterobacteriaceae bei Hobbytieren nachgewiesen werden. Fünf *Ec*- und 35 *Kp*-Isolate sowie ein *Ko*-Isolat von zwei Katzen und 31 Hunden wiesen ein in der Humanmedizin weltweit verbreitetes, ca. 60 kDa großes, transkonjugierbares OXA-48-Plasmid vom Replikontyp IncL auf. Unter den OXA-48-bildenden *Ec*-Isolaten besaßen 80 % zusätzlich ESBL-/AmpC- und PMQR-Gene, dies war bei 69,4 % respektive 97,2 % der *Klebsiella* spp.-Isolate der Fall. Von den fünf OXA-48-bildenden *Ec*-Isolaten gehörten drei zum ST1196 und jeweils ein Isolat zum ST1431 bzw. ST410. Unter den OXA-48-bildenden *Kp*-Isolaten dominierten der ST15 (n=25; 71,4 %) und der ST11 (n=9; 25,7 %). Da alle CP-bildenden Isolate von Tieren aus einer Tierklinik stammten, die OXA-48-Plasmide eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen und jeweils identische Pulsfeldgelelektrophorese-Typen unter den *Ec*-ST1196-, *Kp*-ST15- und *Kp*-ST11-Isolaten gefunden wurden, musste, ähnlich wie bereits für Krankenhäuser in Deutschland und anderen Ländern beschrieben, eine nosokomiale Ausbreitung des Plasmids bzw. seiner bakteriellen Träger angenommen werden. Aufgrund heterogener Untersuchungsergebnisse konnte ein Einfluss des OXA-48-Plasmids auf die Biofilmbildung der Bakterien und somit auf die mögliche Ausbreitung der tragenden Bakterien im klinischen Umfeld nicht abschließend bewertet werden.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass Tiere nicht nur Träger von ESBL-/AmpC- sondern auch von CP-bildenden Enterobacteriaceae sind. Der Nachweis von Sequenz- und Plasmidtypen, die in der Humanmedizin eine bedeutsame Rolle spielen, weist auf eine insbesondere zwischen Hobbytier und Mensch zu vermutenden Übertragung von multiresistenten Bakterien hin, deren Ausmaß und Richtung dringend weiterer Untersuchungen im Sinne eines „One-Health“-Ansatzes bedarf. Gezielte Überwachungsprogramme sind notwendig, um die nosokomiale Ausbreitung multiresistenter Bakterien in Tierkliniken zu identifizieren und interventive Hygienemaßnahmen zu implementieren.

## VII Summary

The global spread of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase (CP)-producing Enterobacteriaceae is currently one of the biggest challenges for public health. Animals are often described as source of ESBL-producing bacteria, whereas their relevance in carrying and transmitting CP-producing bacteria is largely unexplored. Therefore, the aim of this work was to characterize ESBL/CP-producing *Escherichia coli* (*Ec*) and *Klebsiella* (*K.*) spp.-isolates of companion and livestock (cattle/pig) animals. In order to compare resistance types and international clones known to prevail in humans, ESBL/CP variants and *EclK. pneumoniae* (*Kp*) sequence types were determined. The analysis of virulence-associated genes (VAGs) linked with extraintestinal pathogenic *Ec* (ExPEC) and intestinal pathogenic *Ec* was performed to assign *Ec* isolates to pathotypes. Finally, the extent to which a resistance plasmid influences the bacterial biofilm formation was examined.

In the period from June 2012 to February 2014 3582 *Ec*-, 457 *Kp*- and 132 *K. oxytoca* (*Ko*) isolates from bacteriological specimens mainly taken from diseased livestock and companion animals and received from > 400 veterinary practices/clinics, were examined. A total of 280 *Ec*-, 44 *Kp*- and 5 *Ko*-isolates could be confirmed as ESBL-producers. In addition, 38 and 11 AmpC- $\beta$ -lactamase (AmpC)-producing *Ec*- and *Klebsiella* spp. isolates were identified. ESBL-/AmpC-producing *Ec* isolates were most common in cattle (17.4 %) and dogs (11.1 %). ESBL-producing *Klebsiella* spp. isolates were most frequently detected in dogs (22.3 %), but they were significantly less frequent in livestock animals (cattle: 2.6 %, pig: 1.6 %). AmpC-producing *Klebsiella* spp. isolates were only present in dogs. The highest rate of ESBL/AmpC carriage was present in wounds, which were exclusively derived from companion animals (*Ec*: 22.1 %, *Klebsiella* spp., 60.0 %), followed by isolates from urine, skin/hair samples, and from feces.

The most common ESBL type in *Ec* was CTX-M-1 (58.9 %), followed by CTX-M-15 (23.9 %), CTX-M-14 (6.4 %), SHV-12 (6.1 %), and CTX-M-3 (1.8 %). CTX-M-1 was particularly present in livestock (dog and cat: cattle: 17 %, pig 52.7 %, dog and cat: 14.5 %) whereas CTX-M-15, which is widely distributed in humans, mainly occurred in companion animals (cattle: 16.4 %, pig: 14.9 %, dog and cat: 44.8 %). SHV-12 appeared almost exclusively in companion animals. CTX-M-15 (71.4 %) predominated in the ESBL-producing *Klebsiella* spp. isolates. The most common AmpC in the *Ec* isolates was CMY-2 ( $n = 29$ ); DHA-1 and ACC-4 were detected only once. Among the *Klebsiella* spp. isolates, the AmpC DHA-1 (28 %) dominated. For 12 of the 38 AmpC-producing *Ec* isolates a mutation in the AmpC promoter region could be detected, which typically causes hyperproduction of AmpC. Almost all ESBL-/AmpC-

producing *Klebsiella* spp. isolates and 21.7 % of the *Ec* isolates harbored at least one of the fluoroquinolone resistance genes *qnr*, *oqxA/B*, and *aac* (6') -*Ib-cr*.

Eight (8.2 %, 8/97) ESBL-producing intestinal *Ec* isolates of pigs were identified as enterotoxic *Ec* (ETEC), two as atypical enteropathogenic *Ec* (aEPEC). A large proportion of the ESBL/AmpC-producing *Ec* isolates were assigned to phylogroups A (41.5 %) and B1 (24.8 %). Forty-three (13.5 %) isolates were classified into groups B2, D and F, which typically represent ExPEC. These isolates could be assigned to sequence types (ST131, ST405, ST648), which have been identified as major players in the global dissemination of ESBL genes in humans. The detection of numerous ExPEC-associated VAGs also suggests a possible pathogenic potential of these isolates. Also in case of the ESBL-producing *Kp* isolates identified in this study, a clonal lineage of high clinical relevance and wide distribution in human medicine, namely ST15, was predominant.

In this work CP-producing Enterobacteriaceae could be identified in companion animals for the first time. Five *Ec* and 35 *Kp* isolates, derived from two cats and 31 dogs, possessed a 60 kDa, transconjugative OXA-48 plasmid of the Replicon type IncL, which is widely distributed in humans. Among the OXA-48-producing *Ec* isolates, 80 % additionally harbored ESBL/AmpC and PMQR genes; this was also the case for 69.4 % and 97.2 % of the *Klebsiella* spp. isolates, respectively. Three of the five OXA-48-producing *Ec* isolates belonged to ST1196 and one isolate to ST1431 and ST410, respectively. Among the OXA-48-producing *Kp* isolates ST15 (n = 25; 71.4 %) and ST11 (n = 9; 25.7 %) were predominant.

Due to a common origin of the CP-producing isolates from animals in the same veterinary clinic, the high similarity of OXA-48 plasmids and the presence of identical pulsed-field gel electrophoresis types among the *Ec*-ST1196, *Kp*-ST15 and *Kp*-ST11 isolates, a nosocomial spread of the plasmid or its bacterial hosts, similar to what has already been described for hospitals in Germany and other countries, had to be supposed. As biofilm experiments yielded quite heterogenous results, a definite influence of the OXA-48 plasmid on the biofilm forming capacity of bacteria could not be conclusively clarified.

This work could show that animals are not only carriers of ESBL-/AmpC- but also of CP-producing Enterobacteriaceae. The detection of sequence types and plasmid types that play a significant role in human medicine, hints towards a possible transmission of multiresistant bacteria, particularly between companion animals and humans. The extent of transfer and its direction urgently requires further investigations in terms of the "One-Health" approach. Systematic monitoring programs are needed to identify the nosocomial spread of multiresistant bacteria in animal clinics and to implement interventive hygiene measures.

## VIII Literaturverzeichnis

1. Anonymous *European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2015.
2. Pitout, J.D. and K.B. Laupland, *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(3):159-66.
3. Canton, R., et al., *Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(5):413-31.
4. Ewers, C., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(7):646-55.
5. Pitout, J.D., *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance*. Front Microbiol, 2012. **3**:9.
6. Broberg, C.A., M. Palacios, and V.L. Miller, *Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter*. F1000Prime Rep, 2014. **6**:64.
7. Schwaber, M.J., et al., *High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(5):2137-9.
8. Poirel, L., et al., *Expanded-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(5):803-5.
9. Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, and D.L. Paterson, *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(1):1-14.
10. Mathers, A.J., G. Peirano, and J.D. Pitout, *Escherichia coli ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone*. Adv Appl Microbiol, 2015. **90**:109-54.
11. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel, *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!* Trends Mol Med, 2012. **18**(5):263-72.
12. Wendt, C., et al., *First outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing K. pneumoniae in Germany*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(5):563-70.
13. Pitart, C., et al., *First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae in Spain*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9):4398-401.
14. Cuzon, G., et al., *Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates in France*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5):2420-3.
15. Anonymous, *Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger* Epidemiologisches Bulletin Nr. 02/2016, Robert Koch-Institut, 2016:Seite 11-14.
16. Anonymous *Berichte zur Resistenzmonitoringstudie 2011/2012, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)*. 2014. DOI: 10.1007/978-3-319-14866-3.
17. Anonymous, *The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014; European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden* EFSA Journal, 2016. **14** (2):4380.
18. Anonymous, *Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or ampc  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals*. EFSA Journal, 2011. **9**(8):2322.
19. Sharp, H., Valentin L., *Abschätzung des Transfers von ESBL bildenden Escherichia coli zum Menschen für Deutschland*. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2014. **11/12**:467-477.

20. Moodley, A. and L. Guardabassi, *Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal Escherichia coli in pigs and farm workers*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4):1709-11.
21. Dierikx, C., et al., *Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in Dutch broilers and broiler farmers*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(1):60-7.
22. Fischer, J., et al., *Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7):1793-5.
23. Shaheen, B.W., R. Nayak, and D.M. Boothe, *Emergence of a New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical Escherichia coli isolates recovered from companion animals in the United States*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(6):2902-3.
24. Yousfi, M., et al., *First report of NDM-5-producing Escherichia coli ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria*. New Microbes New Infect, 2015. **8**:17-8.
25. Fischer, J., et al., *Salmonella enterica subsp. enterica producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(2):478-80.
26. Aktories, F., Hofmann, Starke, *Allgemeine und spezielle Toxikologie und Pharmakologie*. Vol. 10. Auflage. 2009, München: Elsevier. ISBN:978-3437425226
27. Frey, H.-H., Löscher, W, *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 2010: Enke Verlag. ISBN:9783830410799
28. Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M., *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 2006: Blackwell Publishing. ISBN:9780813806563
29. Perez, F., R.A. Salata, and R.A. Bonomo, *Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria*. Infect Drug Resist, 2008. **1**:27-44.
30. Anonymous *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*, World Health Organization. 2011. **3rd Revision**.
31. Selbitz, T., Valentin-Weigand, *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Vol. 10. 2015, Enke Verlag. ISBN:978-3830412625
32. Livermore, D.M., *Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41 Suppl D**:25-41.
33. Bradford, P.A., *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4):933-51, table of contents.
34. Theuretzbacher, U., *Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren*. Chemotherapie Journal, 1998. **7. Jahrgang; Heft 4**.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute, C., *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition*. 2013.
36. EUCAST, *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016*. 2016.
37. Livermore, D.M. and N. Woodford, *The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter*. Trends Microbiol, 2006. **14**(9):413-20.
38. Rupp, M.E. and P.D. Fey, *Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment*. Drugs, 2003. **63**(4):353-65.
39. Payne, D.J., W. Du, and J.H. Bateson, *beta-Lactamase epidemiology and the utility of established and novel beta-lactamase inhibitors*. Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(2):247-61.
40. Ambler, R.P., *The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **289**(1036):321-31.
41. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6):1211-33.

42. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3):969-76.
43. Philippon, A., G. Arlet, and G.A. Jacoby, *Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(1):1-11.
44. Rubin, J.E. and J.D. Pitout, *Extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals*. Vet Microbiol, 2014. **170**(1-2):10-8.
45. D'Andrea, M.M., et al., *CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance*. Int J Med Microbiol, 2013. **303**(6-7):305-17.
46. Ewers, C., et al., *Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant Citrobacter freundii*. Int J Antimicrob Agents, 2011. **37**(1):86-7.
47. Petit, A., et al., *Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(2):219-24.
48. Sougakoff, W., et al., *Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(4):879-84.
49. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4):557-84.
50. Kliebe, C., et al., *Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **28**(2):302-7.
51. Bonnet, R., *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1):1-14.
52. Ben Salem, R., et al., *Incl1 Plasmids Carrying blaCTX-M-1 or blaCMY-2 Genes in Escherichia coli from Healthy Humans and Animals in Tunisia*. Microb Drug Resist, 2014. **20**(5):495-500.
53. Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart, *A new plasmidic cefotaxime in a clinical isolate of Escherichia coli*. Infection, 1990. **18**(5):294-8.
54. Canton, R., J.M. Gonzalez-Alba, and J.C. Galan, *CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion*. Front Microbiol, 2012. **3**:110.
55. Sanders, C.C., *Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**:573-93.
56. Papanicolaou, G.A., A.A. Medeiros, and G.A. Jacoby, *Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(11):2200-9.
57. Knothe, H., et al., *Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection, 1983. **11**(6):315-7.
58. Philippon, A., R. Labia, and G. Jacoby, *Extended-spectrum beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(8):1131-6.
59. Gutmann, L., et al., *SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams*. Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(6):951-6.
60. Rice, L.B., et al., *Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(11):2193-9.
61. Naumovski, L., et al., *Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(9):1991-6.
62. Sidjabat, H.E., et al., *Molecular epidemiology of CTX-M-producing Escherichia coli isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(11):4733-9.



63. Teshager, T., et al., *Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing Escherichia coli strain from a dog with recurrent urinary tract infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(12):3483-4.
64. Feria, C., et al., *Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs in Portugal*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(1):77-85.
65. Costa, D., et al., *Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in Escherichia coli strains from healthy pets in Portugal*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(5):960-1.
66. Carattoli, A., et al., *Extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(2):833-5.
67. Vo, A.T., et al., *Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from horses*. Vet Microbiol, 2007. **124**(3-4):248-55.
68. Frye, J.G. and P.J. Fedorka-Cray, *Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in Salmonella enterica isolated from animals in the USA from 1999 to 2003*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **30**(2):134-42.
69. O'Keefe, A., et al., *First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli urinary tract isolates from dogs and cats in the United States*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8):3489-92.
70. Moreno, A., et al., *Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by Escherichia coli strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin*. Vet Microbiol, 2008. **129**(1-2):203-8.
71. Ma, J., et al., *High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6)-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2):519-24.
72. Sun, Y., et al., *High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(9):1475-81.
73. Gibson, J.S., R.N. Cobbald, and D.J. Trott, *Characterization of multidrug-resistant Escherichia coli isolated from extraintestinal clinical infections in animals*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 5):592-8.
74. Bogaerts, P., et al., *Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe*. Microb Drug Resist, 2015.
75. Fey, P.D., et al., *Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle*. N Engl J Med, 2000. **342**(17):1242-9.
76. Brinas, L., et al., *Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in Escherichia coli fecal-sample isolates from healthy chickens*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(6):2056-8.
77. Kojima, A., et al., *Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8):3533-7.
78. Li, X.Z., et al., *beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin*. Vet Microbiol, 2007. **121**(3-4):197-214.
79. Garcia-Cobos, S., et al., *Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended-Spectrum and AmpC beta-Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones*. PLoS One, 2015. **10**(7):e0134533.
80. Liebana, E., et al., *Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(7):1030-7.

81. Laube, H., et al., *Transmission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from broiler chicken farms to surrounding areas*. Vet Microbiol, 2014. **172**(3-4):519-27.
82. Van Boeckel, T.P., et al., *Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data*. Lancet Infect Dis, 2014. **14**(8):742-50.
83. Anonymous *The State of the World's Antibiotics, 2015; The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*. 2015.
84. Anonymous *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2012; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden* 2014.
85. Nordmann, P., *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge*. Med Mal Infect, 2014. **44**(2):51-6.
86. Thomson, G.K., et al., *Co-Production of KPC-18 and VIM-1 Carbapenemases by Enterobacter cloacae: Implications for Newer beta-Lactam-beta-Lactamase Inhibitor Combinations*. J Clin Microbiol, 2015.
87. Brown, S. and S. Amyes, *OXA (beta)-lactamases in Acinetobacter: the story so far*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(1):1-3.
88. Patel, G. and R.A. Bonomo, "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Front Microbiol, 2013. **4**:48.
89. Poirel, L., C. Heritier, and P. Nordmann, *Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of Shewanella oneidensis as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1):348-51.
90. Yang, Y.J., P.J. Wu, and D.M. Livermore, *Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two Serratia marcescens isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(5):755-8.
91. Rasmussen, B.A., et al., *Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(9):2080-6.
92. Ito, H., et al., *Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(4):824-9.
93. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(10):1791-8.
94. Yigit, H., et al., *Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4):1151-61.
95. Anonymous, *Plasmid-vermittelter Multispezies-Ausbruch mit Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae*. Epidemiologisches Bulletin Nr. 47/2014, Robert Koch-Institut, 2014:455-459.
96. Glupczynski, Y., et al., *Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(2):168-72.
97. Dautzenberg, M.J., et al., *Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011*. Euro Surveill, 2014. **19**(9).
98. Kaase, M., et al., *Multicentre investigation of carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in German hospitals*. Int J Med Microbiol, 2016.
99. Glasner, C., et al., *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013*. Eurosurveillance, 2013. **18**(28):9-15.
100. Anonymous *Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*. 2015.
101. Poirel, L., et al., *Carbapenemase-producing Acinetobacter spp. in Cattle, France*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(3):523-5.
102. Wang, Y., et al., *Identification of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 in Acinetobacter lwoffii of food animal origin*. PLoS One, 2012. **7**(5):e37152.

103. Zhang, W.J., et al., *Complete sequence of the bla(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from Acinetobacter baumannii of food animal origin*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(7):1681-2.
104. Al Bayssari, C., et al., *Emergence of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in livestock animals in Lebanon*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(3):950-1.
105. Smet, A., et al., *OXA-23-producing Acinetobacter species from horses: a public health hazard?* J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(12):3009-10.
106. Pomba, C., et al., *First report of OXA-23-mediated carbapenem resistance in sequence type 2 multidrug-resistant Acinetobacter baumannii associated with urinary tract infection in a cat*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(2):1267-8.
107. Al Bayssari, C., et al., *Emergence of OXA-48-producing Escherichia coli clone ST38 in fowl*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(1):745-6.
108. Wang, Y., et al., *IMP-45-producing multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa of canine origin*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(9):2579-81.
109. Zhang, R., et al., *Characterization of NDM-1-producing carbapenemase in Acinetobacter spp. and E. coli isolates from diseased pigs*. Front. Agr. Sci. Eng., 2015. **2**:223-229.
110. Ewers, C., et al., *Genome sequence of OXA-23 producing Acinetobacter baumannii IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone IC1*. Gut Pathog, 2016. **8**:37.
111. Fischer, J., et al., *NDM-1 carbapenemase-producing Salmonella enterica subsp. enterica serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(12):2954-6.
112. Schmiedel, J., et al., *Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany*. BMC Microbiol, 2014. **14**:187.
113. Liu, X., K. Thungrat, and D.M. Boothe, *Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and Other beta-Lactamase Genes in ESBL-Producing Multidrug Resistant Escherichia coli from Dogs and Cats in the United States, 2009-2013*. Front Microbiol, 2016. **7**:1057.
114. Youssfi, M., et al., *Emergence of Carbapenemase-Producing Escherichia coli Isolated from Companion Animals in Algeria*. Microb Drug Resist, 2016.
115. Dolejska, M., et al., *High prevalence of Salmonella and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(1):63-70.
116. Abraham, S., et al., *Isolation and plasmid characterization of carbapenemase (IMP-4) producing Salmonella enterica Typhimurium from cats*. Sci Rep, 2016. **6**:35527.
117. Braun, S.D., et al., *Surveillance of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Dairy Cattle Farms in the Nile Delta, Egypt*. Front Microbiol, 2016. **7**:1020.
118. Gonzalez-Torralba, A., et al., *Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Companion Dogs in Madrid, Spain*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(4):2499-501.
119. Hamza, E., S.M. Dorgham, and D.A. Hamza, *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in broiler poultry farming in Egypt*. J Glob Antimicrob Resist, 2016. **7**:8-10.
120. Carattoli, A., et al., *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. J Microbiol Methods, 2005. **63**(3):219-28.
121. Carattoli, A., et al., *In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(7):3895-903.
122. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6):2227-38.

123. Seiffert, S.N., et al., *Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?* Drug Resist Updat, 2013. **16**(1-2):22-45.
124. Strahilevitz, J., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.* Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4):664-89.
125. Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies.* Front Microbiol, 2012. **3**:24.
126. Nordmann, P., et al., *The emerging NDM carbapenemases.* Trends Microbiol, 2011. **19**(12):588-95.
127. Carattoli, A., et al., *Evolution of IncA/C bla<sub>CMY</sub>-(2)-carrying plasmids by acquisition of the bla<sub>NDM</sub>-(1) carbapenemase gene.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(2):783-6.
128. D'Andrea, M.M., et al., *CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of Proteus mirabilis from northern Italy.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2):618-24.
129. Carattoli, A., *Plasmids and the spread of resistance.* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(6-7):298-304.
130. Carattoli, A., et al., *Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance.* PLoS One, 2015. **10**(5):e0123063.
131. Kola, A., et al., *High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany.* J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(11):2631-4.
132. Poirel, L., R.A. Bonnin, and P. Nordmann, *Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1):559-62.
133. Oteo, J., et al., *AmpC beta-lactamases in Escherichia coli: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **67**(3):270-6.
134. Tenaillon, O., et al., *The population genetics of commensal Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(3):207-17.
135. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2):123-40.
136. Ochman, H. and R.K. Selander, *Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations.* J Bacteriol, 1984. **157**(2):690-3.
137. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10):4555-8.
138. Clermont, O., et al., *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.* Environ Microbiol Rep, 2013. **5**(1):58-65.
139. Contreras, C.A., et al., *Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from Peruvian children.* J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 5):639-46.
140. Askari Badouei, M., M. Jajarmi, and A. Mirsalehian, *Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from humans and ruminants.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2015. **38**:15-20.
141. Croxen, M.A., et al., *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli.* Clinical Microbiology Reviews, 2013. **26**(4):822-880.
142. Gyles, C.L., *Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview.* J Anim Sci, 2007. **85**(13 Suppl):E45-62.
143. Moxley, R.A., *Edema disease.* Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice, 2000. **16**(1):175-+.

144. Gyles, C.L., *Shiga toxin-producing Escherichia coli: The big picture*. Journal of Animal Science, 2006. **84**:99-99.
145. Lee, J.H., J. Hur, and B.D. Stein, *Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic Escherichia coli O26 and O111 in calves associated with diarrhea*. Vet J, 2008. **176**(2):205-9.
146. Levine, M.M., *Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent*. J Infect Dis, 1987. **155**(3):377-89.
147. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1):142-201.
148. Handl, C.E., E. Olsson, and J.I. Flock, *Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1992. **15**(6):505-10.
149. Nagy, B. and P.Z. Fekete, *Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7):443-54.
150. Trabulsi, L.R., R. Keller, and T.A. Tardelli Gomes, *Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(5):508-13.
151. Johnson, J.R. and T.A. Russo, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli"*. J Lab Clin Med, 2002. **139**(3):155-62.
152. Smith, J.L., P.M. Fratamico, and N.W. Gunther, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis, 2007. **4**(2):134-63.
153. Dale, A.P. and N. Woodford, *Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC): Disease, carriage and clones*. J Infect, 2015. **71**(6):615-26.
154. Köhler, D., *What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli?* International Journal of Medical Microbiology, 2011. **301**:642-647.
155. Wiles, T.J., R.R. Kulesus, and M.A. Mulvey, *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli*. Exp Mol Pathol, 2008. **85**(1):11-9.
156. Ewers, C., et al., *Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they?* Int J Med Microbiol, 2007. **297**(3):163-76.
157. Anonymous *GERMAP 2015 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.* 2016.
158. Canton, R. and T.M. Coque, *The CTX-M beta-lactamase pandemic*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(5):466-75.
159. Peirano, G. and J.D. Pitout, *Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(4):316-21.
160. Guenther, S., C. Ewers, and L.H. Wieler, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing E. coli in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?* Front Microbiol, 2011. **2**:246.
161. Schaufli, K., et al., *Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing Escherichia coli of ST410-another successful pandemic clone?* FEMS Microbiol Ecol, 2016. **92**(1).
162. Vila, J., et al., *Are quinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli less virulent?* J Infect Dis, 2002. **186**(7):1039-42.
163. Johnson, J.R., *Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(1):80-128.
164. Velasco, M., et al., *Decreased invasive capacity of quinolone-resistant Escherichia coli in patients with urinary tract infections*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(10):1682-6.
165. Johnson, J.R., et al., *Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among Escherichia coli isolates from animals and humans*. J Infect Dis, 2003. **188**(5):759-68.

166. Johnson, J.R. and T.A. Russo, *Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7):383-404.
167. Wagner, S., D.L. Gally, and S.A. Argyle, *Multidrug-resistant Escherichia coli from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons*. Vet Microbiol, 2014. **169**(3-4):171-8.
168. Moreno, E., et al., *Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(2):204-11.
169. Brisse, S., et al., *Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization*. PLoS One, 2009. **4**(3):e4982.
170. Anonymous, *Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2011 Abschlussbericht 2011*, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, Robert Koch-Institut.
171. Podschun, R. and U. Ullmann, *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4):589-603.
172. Struve, C. and K.A. Krogfelt, *Pathogenic potential of environmental Klebsiella pneumoniae isolates*. Environ Microbiol, 2004. **6**(6):584-90.
173. Li, B., et al., *Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol, 2014. **9**(9):1071-81.
174. Karama, E.M., et al., *Endogenous endophthalmitis complicating Klebsiella pneumoniae liver abscess in Europe: case report*. Int Ophthalmol, 2008. **28**(2):111-3.
175. Siu, L.K., et al., *Klebsiella pneumoniae liver abscess: a new invasive syndrome*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(11):881-7.
176. Chang, A.C., et al., *Pyogenic liver abscess trends in South Australia*. ANZ J Surg, 2015. **85**(3):179-82.
177. Schroll, C., et al., *Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation*. BMC Microbiol, 2010. **10**:179.
178. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology*. Trends Microbiol, 2003. **11**(10):479-87.
179. Oteo, J., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(2):173-6.
180. Pitout, J.D., et al., *Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(7):2846-51.
181. Ruiz, S.J., et al., *First characterization of CTX-M-15-producing Escherichia coli ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(5):1993-6.
182. Tian, G.B., et al., *Sequence type ST405 Escherichia coli isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8):3966-7.
183. Ewers, C., et al., *CTX-M-15-D-ST648 Escherichia coli from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?* J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(5):1224-30.
184. Coque, T.M., et al., *Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(2):195-200.
185. Platell, J.L., et al., *Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic Escherichia coli of sequence type ST131 in animals and foods*. Vet Microbiol, 2011. **153**(1-2):99-108.

186. Johnson, J.R., et al., *Sharing of Escherichia coli sequence type ST131 and other multidrug-resistant and Urovirulent E. coli strains among dogs and cats within a household*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(11):3721-5.
187. Pomba, C., et al., *Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent Escherichia coli CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(1):327-8.
188. Cortes, P., et al., *Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant Escherichia coli strains from chicken and pig farms in Spain*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(9):2799-805.
189. Dahmen, S., et al., *Characterization of blaCTX-M IncFII plasmids and clones of Escherichia coli from pets in France*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(12):2797-801.
190. Schink, A.K., et al., *Analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(8):1741-9.
191. Ewers, C., et al., *Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(4):651-60.
192. Mora, A., et al., *Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 ibeA strains among Escherichia coli poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(21):6991-7.
193. Vincent, C., et al., *Food reservoir for Escherichia coli causing urinary tract infections*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(1):88-95.
194. Johnson, J.R., et al., *Within-household sharing of a fluoroquinolone-resistant Escherichia coli sequence type ST131 strain causing pediatric osteoarticular infection*. Pediatr Infect Dis J, 2010. **29**(5):473-5.
195. Oteo, J., M. Perez-Vazquez, and J. Campos, *Extended-spectrum [beta]-lactamase producing Escherichia coli: changing epidemiology and clinical impact*. Curr Opin Infect Dis, 2010. **23**(4):320-6.
196. Carattoli, A., *Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(8):654-8.
197. Kim, J., et al., *Characterization of IncF plasmids carrying the blaCTX-M-14 gene in clinical isolates of Escherichia coli from Korea*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(6):1263-8.
198. Wu, G., et al., *Comparative analysis of ESBL-positive Escherichia coli isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany*. PLoS One, 2013. **8**(9):e75392.
199. Alghoribi, M.F., et al., *Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic Escherichia coli clones in Riyadh, Saudi Arabia*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(10):2757-62.
200. Huber, H., et al., *ESBL-producing uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs and cats in Switzerland*. Vet Microbiol, 2013. **162**(2-4):992-6.
201. Hu, Y.Y., et al., *Molecular typing of CTX-M-producing escherichia coli isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(19):5988-96.
202. Usui, M., et al., *The role of flies in spreading the extended-spectrum beta-lactamase gene from cattle*. Microb Drug Resist, 2013. **19**(5):415-20.
203. Dobiasova, H., et al., *Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among Escherichia coli isolates from zoo animals, Czech Republic*. FEMS Microbiol Ecol, 2013. **85**(3):604-11.
204. Dierikx, C.M., et al., *Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(6):1368-74.

205. Van der Bij, A.K., et al., *The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related Escherichia coli that produce CTX-Ms*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **72**(4):297-302.
206. Sekizuka, T., et al., *Complete sequencing of the bla(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from Escherichia coli ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens*. PLoS One, 2011. **6**(9):e25334.
207. Bonnin, R.A., et al., *Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from Escherichia coli ST131*. PLoS One, 2012. **7**(4):e34752.
208. Bushnell, G., F. Mitrani-Gold, and L.M. Mundy, *Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance*. Int J Infect Dis, 2013. **17**(5):e325-33.
209. Potron, A., et al., *Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011*. Euro Surveill, 2013. **18**(31).
210. Netikul, T., et al., *Characterization of an IncN2-type blaNDM-(1)-carrying plasmid in Escherichia coli ST131 and Klebsiella pneumoniae ST11 and ST15 isolates in Thailand*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(11):3161-3.
211. Zurfluh, K., et al., *Emergence of Escherichia coli producing OXA-48 beta-lactamase in the community in Switzerland*. Antimicrob Resist Infect Control, 2015. **4**:9.
212. Mavroidi, A., et al., *Emergence of Escherichia coli sequence type 410 (ST410) with KPC-2 beta-lactamase*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(3):247-50.
213. Cai, J.C., et al., *Emergence of Escherichia coli sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(2):1146-52.
214. Diancourt, L., et al., *Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(8):4178-82.
215. Ewers, C., et al., *Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 Klebsiella pneumoniae in companion animals and horses*. J Antimicrob Chemother, 2014.
216. Damjanova, I., et al., *Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? J Antimicrob Chemother, 2008. **62**(5):978-85.*
217. Breurec, S., et al., *Klebsiella pneumoniae resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(4):349-55.
218. Poirel, L., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae of sequence type ST274 in companion animals*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(5):2372-5.
219. Liapis, E., et al., *Molecular epidemiology of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in France*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(12):O1121-3.
220. Oteo, J., et al., *Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(6):3406-12.
221. Melegh, S., et al., *Emergence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae ST15 clone in the Clinical Centre University of Pecs, Hungary*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(1):O27-9.
222. Rodrigues, C., et al., *Detection of VIM-34, a novel VIM-1 variant identified in the intercontinental ST15 Klebsiella pneumoniae clone*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(1):274-5.
223. Poirel, L., et al., *Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Morocco*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(12):2781-3.
224. Kitchel, B., et al., *Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(8):3365-70.



225. Jain, R., et al., *Emergence of Carbapenemase-producing Klebsiella Pneumoniae of Sequence type 258 in Michigan, USA*. Infect Dis Rep, 2013. **5**(1):e5.
226. Chen, L., et al., *Epidemic Klebsiella pneumoniae ST258 is a hybrid strain*. MBio, 2014. **5**(3):e01355-14.
227. Qi, Y., et al., *ST11, the dominant clone of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in China*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(2):307-12.
228. Hidalgo, L., et al., *Klebsiella pneumoniae sequence type 11 from companion animals bearing ArmA methyltransferase, DHA-1 beta-lactamase, and QnrB4*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(9):4532-4.
229. Donati, V., et al., *Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in klebsiella spp. from companion animals in Italy*. PLoS One, 2014. **9**(3):e90564.
230. Voulgari, E., et al., *Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece involving an ST11 clone*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(1):84-8.
231. Pena, I., et al., *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 isolates*. Int J Antimicrob Agents, 2014. **43**(5):460-4.
232. Voulgari, E., et al., *The Balkan region: NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(8):2091-7.
233. Branas, P., et al., *Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **46**(1):111-6.
234. Bisping, A., *Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere*. 1988: Parey Verlag. ISBN:3826329708
235. CLSI, *VET01S, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, 3rd Edition. 2015.
236. CLSI, *M100S, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2016. **26**.
237. CLSI, *M100-S25, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. 2015.
238. Caroff, N., et al., *Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of Escherichia coli hyperproducing ampC*. J Antimicrob Chemother, 2000. **45**(6):783-8.
239. Bosworth, B.T., *Identification of toxin and pilus genes in porcine Escherichia coli using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs*, in 97th General meeting of the American Society for Microbiology. 1997: Miami Beach, USA.
240. Barth, S., et al., *Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding Escherichia coli isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2007. **120**(7-8):307-16.
241. Van Bost, S., et al., *Multiplex PCRs for identification of necrotogenic Escherichia coli*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9):4480-2.
242. Franck, S.M., B.T. Bosworth, and H.W. Moon, *Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(6):1795-7.
243. Nguyen, T.V., et al., *Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2):755-60.
244. Wirth, T., et al., *Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective*. Mol Microbiol, 2006. **60**(5):1136-51.
245. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9):2233-9.
246. Schaufler, K., et al., *ESBL-plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be "cured" of wild-type Escherichia coli using a heat technique*. Gut Pathog, 2013. **5**(1):34.

247. Martinez-Medina, M., et al., *Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC)*. BMC Microbiology, 2009. **9**.
248. Richter, A.M., et al., *Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak Escherichia coli O104:H4*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(12):1622-37.
249. Wilson, G. and D. McCabe, *The use of antibiotic-containing agars for the isolation of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in intensive care units*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(4):451-3.
250. Clemente, L., et al., *Antimicrobial susceptibility and oxymino-beta-lactam resistance mechanisms in Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from different animal sources*. Res Microbiol, 2015. **166**(7):574-83.
251. Wieler, L.H., et al., *Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(8):635-41.
252. Friese, A., et al., *Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing E. coli from animal farms in Germany*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2013. **126**(3-4):175-80.
253. Randall, L.P., et al., *Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli from pigs at slaughter in the UK in 2013*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(11):2947-50.
254. Hille, K., et al., *[On the occurrence of extended-spectrum- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in livestock: results of selected European studies]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2014. **127**(9-10):403-11.
255. Adler, A., et al., *Prevalence, risk factors and transmission dynamics of ESBL-producing Enterobacteriaceae: a national survey of cattle farms in Israel, 2013*. J Clin Microbiol, 2015.
256. Hordijk, J., et al., *Cross-sectional study on prevalence and molecular characteristics of plasmid mediated ESBL/AmpC-producing Escherichia coli isolated from veal calves at slaughter*. PLoS One, 2013. **8**(5):e65681.
257. Anonymous, *The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013*; European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden EFSA Journal, 2015. **13**(2):4036.
258. Anonymous GERMAP 2012 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2014.
259. Dolejska, M., et al., *Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli isolates from an equine clinic and a horseback riding centre*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(4):757-64.
260. Maddox, T.W., et al., *Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant Escherichia coli and methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Equine Vet J, 2012. **44**(3):289-96.
261. Hordijk, J., et al., *High prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs*. Front Microbiol, 2013. **4**:242.
262. Shaheen, B.W., et al., *Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical Escherichia coli isolates from companion animals in the United States*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(12):5666-75.
263. Belas, A., et al., *Risk factors for faecal colonisation with Escherichia coli producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in dogs*. Vet Rec, 2014. **175**(8):202.
264. Anonymous Swedres-Svrm 2014. Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. 2015.

265. Locatelli, C., et al., *CTX-M1 ESBL-producing Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae isolated from cases of bovine mastitis*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(10):3822-3.
266. Saishu, N., H. Ozaki, and T. Murase, *CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolated from cases of bovine mastitis in Japan*. J Vet Med Sci, 2014. **76**(8):1153-6.
267. Timofte, D., et al., *Detection and molecular characterization of Escherichia coli CTX-M-15 and Klebsiella pneumoniae SHV-12 beta-lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(2):789-94.
268. Lewis, J.A., et al., *Multi-locus sequence typing of Escherichia coli isolates with acquired ampC genes and ampC promoter mutations*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016.
269. Valentin, L., et al., *Subgrouping of ESBL-producing Escherichia coli from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(7):805-16.
270. Agerso, Y., et al., *Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing Escherichia coli in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(3):582-8.
271. Ramos, S., et al., *Clonal diversity of ESBL-producing Escherichia coli in pigs at slaughter level in Portugal*. Foodborne Pathog Dis, 2013. **10**(1):74-9.
272. Lahlaoui, H., A. Ben Haj Khalifa, and M. Ben Moussa, *Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum beta-lactamase (ESBL)*. Med Mal Infect, 2014. **44**(9):400-4.
273. Zurfluh, K., et al., *Long-term shedding of CTX-M-15-producing Escherichia coli B2:ST127 by a healthy asymptomatic carrier*. Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(4):466.
274. Rocha-Gracia, R.C., et al., *Faecal Escherichia coli isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 beta-lactamases*. Vet J, 2015. **203**(3):315-9.
275. Zheng, H., et al., *Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst Escherichia coli isolates from healthy food animals in China*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4):305-10.
276. Tamang, M.D., et al., *Prevalence and molecular characterization of CTX-M beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from healthy swine and cattle*. Foodborne Pathog Dis, 2013. **10**(1):13-20.
277. Rao, L., et al., *Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012*. Vet Microbiol, 2014. **172**(3-4):534-41.
278. Harada, K., Y. Nakai, and Y. Kataoka, *Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 beta-lactamase in extraintestinal pathogenic Escherichia coli from dogs and cats in Japan*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(7):480-5.
279. Tamang, M.D., et al., *Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from stray dogs in South Korea*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5):2705-12.
280. Pfeifer, Y. and C. Eller, *[Current data and trends about the resistance of Gram-negative pathogens to beta-lactams]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2012. **55**(11-12):1405-9.
281. Dahmen, S., J.Y. Madec, and M. Haenni, *F2:A-B- plasmid carrying the extended-spectrum beta-lactamase bla(CTX-M-55/57) gene in Proteus mirabilis isolated from a primate*. Int J Antimicrob Agents, 2013. **41**(6):594-5.
282. Leistner, R., et al., *Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Escherichia coli from bloodstream infection*. Infect Drug Resist, 2014. **7**:57-62.

283. Liao, X.P., et al., *Characterization of CTX-M-14-producing Escherichia coli from food-producing animals*. Front Microbiol, 2015. **6**:1136.
284. Meireles, D., et al., *Molecular characterization of quinolone resistance mechanisms and extended-spectrum beta-lactamase production in Escherichia coli isolated from dogs*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2015. **41**:43-8.
285. Endimiani, A., et al., *First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli from broilers, swine, and cattle in Switzerland*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **73**(1):31-8.
286. Wasyl, D., et al., *Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic Escherichia coli from food-producing animals slaughtered in Poland*. Microb Drug Resist, 2012. **18**(1):79-82.
287. Bortolaia, V., et al., *High diversity of plasmids harbouring blaCMY-2 among clinical Escherichia coli isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(6):1492-6.
288. Haenni, M., et al., *High prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(9):5358-62.
289. Damborg, P., et al., *Selection of CMY-2 producing Escherichia coli in the faecal flora of dogs treated with cephalexin*. Vet Microbiol, 2011. **151**(3-4):404-8.
290. Haenni, M., et al., *Veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae ST15 clone*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(3):770-1.
291. Rodrigues, C., et al., *Expansion of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK)*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(8):1100-8.
292. Chudackova, E., et al., *Carbapenem-nonsusceptible strains of Klebsiella pneumoniae producing SHV-5 and/or DHA-1 beta-lactamases in a Czech hospital*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **309**(1):62-70.
293. Shin, S.Y., et al., *Resistance to carbapenems in sequence type 11 Klebsiella pneumoniae is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 2):239-45.
294. Wohlwend, N., et al., *Third-generation-cephalosporin-resistant Klebsiella pneumoniae isolates from humans and companion animals in Switzerland: spread of a DHA-producing sequence type 11 clone in a veterinary setting*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(5):2949-55.
295. Ewers, C., et al., *Detection of Shiga toxin- and extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli O145:NM and Ont:NM from calves with diarrhoea*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(7):2005-7.
296. van Rennings, L., et al., *Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany*. PLoS One, 2015. **10**(3):e0119114.
297. Friedrich, A.W., et al., *Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms*. J Infect Dis, 2002. **185**(1):74-84.
298. Fasel, D., et al., *Hemolytic uremic syndrome in a 65-Year-old male linked to a very unusual type of stx2e- and eae-harboring O5:H49 shiga toxin-producing Escherichia coli*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(4):1301-3.
299. Mandakini, R., et al., *ESBL-producing Shiga-toxigenic E. coli (STEC) associated with piglet diarrhoea in India*. Trop Anim Health Prod, 2015. **47**(2):377-81.
300. Melkebeek, V., B.M. Goddeeris, and E. Cox, *ETEC vaccination in pigs*. Vet Immunol Immunopathol, 2013. **152**(1-2):37-42.
301. Qadri, F., et al., *Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(3):465-83.
302. Abraham, S., et al., *Phylogenetic and molecular insights into the evolution of multidrug-resistant porcine enterotoxigenic Escherichia coli in Australia*. Int J Antimicrob Agents, 2014. **44**(2):105-11.

303. Boerlin, P., et al., *Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(11):6753-61.
304. Kim, J.S., et al., *Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing diarrheagenic Escherichia coli isolates in the Republic of Korea during 2008-2011*. J Microbiol Biotechnol, 2014. **24**(3):421-6.
305. Hu, J. and A.G. Torres, *Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander?* Clin Microbiol Infect, 2015. **21**(8):729-34.
306. Hernandez, R.T., et al., *An overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **297**(2):137-49.
307. Ishii, Y., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive Escherichia coli O26:H11: a new concern*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3):1072-5.
308. Kon, M., et al., *[Cefotaxime-resistant shiga toxin-producing Escherichia coli O26 : H11 isolated from a patient with diarrhea]*. Kansenshogaku Zasshi, 2005. **79**(3):161-8.
309. Buvens, G., et al., *Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing Escherichia coli and first description of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase in serogroup O26*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(11):4907-9.
310. Dutta, T.K., et al., *Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolate possessing the Shiga toxin gene (stx1) belonging to the O64 serogroup associated with human disease in India*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(6):2008-9.
311. Torpdahl, M., et al., *Detection of a Shiga toxin- and extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli O157:H7 human clinical isolate*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(5):1203-4.
312. Arvand, M., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (stx1)-positive Escherichia coli O91:H14 carrying blaCTX-M-15 on an IncI1-ST31 plasmid isolated from a human patient in Germany*. Int J Med Microbiol, 2015. **305**(3):404-7.
313. Kawahara, R., et al., *Characterization of Third-Generation-Cephalosporin-Resistant Shiga Toxin-Producing Strains of Escherichia coli O157:H7 in Japan*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(9):3035-8.
314. Valat, C., et al., *CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a shiga toxin-producing Escherichia coli isolate of serotype O111:H8*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(4):1308-9.
315. Roest, H.I., et al., *[Antibiotic resistance in Escherichia coli O157 isolated between 1998 and 2003 in The Netherlands]*. Tijdschr Diergeneesk, 2007. **132**(24):954-8.
316. Mellmann, A., et al., *Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology*. PLoS One, 2011. **6**(7):e22751.
317. Kameyama, M., et al., *Detection of CMY-2 AmpC beta-lactamase-producing enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 from outbreak strains in a nursery school in Japan*. J Infect Chemother, 2015. **21**(7):544-6.
318. Valat, C., et al., *Draft Genome Sequences of Enterohemorrhagic Escherichia coli Encoding Extended-Spectrum Beta-Lactamases*. Genome Announc, 2016. **4**(1).
319. Memariani, M., et al., *Occurrence of SHV, TEM and CTX-M beta-Lactamase Genes Among Enteropathogenic Escherichia coli Strains Isolated From Children With Diarrhea*. Jundishapur J Microbiol, 2015. **8**(4):e15620.
320. Vignoli, R., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(6):2940-3.
321. Jorgensen, S.B., et al., *High prevalence of faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Norwegian patients with gastroenteritis*. Scand J Infect Dis, 2014. **46**(6):462-5.

- 322. Hao, R., et al., *Quinolone-resistant Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. *J Clin Microbiol*, 2012. **50**(7):2450-1.
- 323. Poeta, P., et al., Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases recovered from diarrhoeic rabbits. *Zoonoses Public Health*, 2010. **57**(3):162-70.
- 324. Jernberg, C., et al., Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 2010. **156**(Pt 11):3216-23.
- 325. Matsumura, Y., et al., CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother*, 2015. **70**(6):1639-49.
- 326. Matsumura, Y., et al., Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and *IncF* plasmids with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(10):4736-42.
- 327. Nicolas-Chanoine, M.H., X. Bertrand, and J.Y. Madec, *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*, 2014. **27**(3):543-74.
- 328. Poeta, P., et al., Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *J Basic Microbiol*, 2008. **48**(5):385-92.
- 329. Johnson, J.R., et al., Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(6):838-46.
- 330. Bergeron, C.R., et al., Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis*, 2012. **18**(3):415-21.
- 331. Nordstrom, L., C.M. Liu, and L.B. Price, Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Front Microbiol*, 2013. **4**:29.
- 332. Fam, N., et al., CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb Drug Resist*, 2011. **17**(1):67-73.
- 333. Adler, A., et al., Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin Microbiol Infect*, 2012. **18**(12):E497-505.
- 334. Manges, A.R., et al., Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. *Foodborne Pathog Dis*, 2015. **12**(4):302-10.
- 335. Riley, L.W., Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(5):380-90.
- 336. Toval, F., et al., Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(2):407-18.
- 337. Liu, X., K. Thungrat, and D.M. Boothe, Multilocus Sequence Typing and Virulence Profiles in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cats in the United States. *PLoS One*, 2015. **10**(11):e0143335.
- 338. Tausova, D., et al., *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother*, 2012. **67**(5):1103-7.
- 339. Dhanji, H., et al., Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother*, 2011. **66**(3):512-6.
- 340. Maravic, A., et al., Prevalence and diversity of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from marine beach waters. *Mar Pollut Bull*, 2015. **90**(1-2):60-7.
- 341. Brolund, A., et al., Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(6):O344-52.

342. Maluta, R.P., et al., *Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) Escherichia coli isolated in Brazil*. PLoS One, 2014. **9**(8):e105016.
343. Anonymous, *Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen; Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI)*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2012. **55**:1311-1354.
344. Li, L., et al., *Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from chickens in Anhui province, China*. PLoS One, 2014. **9**(8):e104356.
345. Paterson, D.L., et al., *Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(3):473-8.
346. Dolejska, M., et al., *Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli and Salmonella from animals, the environment and humans*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(2):333-9.
347. Li, J.J., et al., *Complete sequence of a conjugative incN plasmid harboring blaKPC-2, blaSHV-12, and qnrS1 from an Escherichia coli sequence type 648 strain*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(11):6974-7.
348. Wallmann, J., *Antibiotikaabgabemengen und Kennzahlen zur Therapiehäufigkeit*, in 8. Leipziger Tierärztekongress. 2015, Leipziger Blaue Hefte. 514-519.
349. Poirel, L., et al., *Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1):15-22.
350. Pfeifer, Y., et al., *Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(4):2125-8.
351. Thomas, C.P., et al., *Early (2008-2010) hospital outbreak of Klebsiella pneumoniae producing OXA-48 carbapenemase in the UK*. Int J Antimicrob Agents, 2013. **42**(6):531-6.
352. Gottig, S., et al., *In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(12):1808-15.
353. Haverkate, M.R., et al., *Within-Host and Population Transmission of blaOXA-48 in K. pneumoniae and E. coli*. PLoS One, 2015. **10**(10):e0140960.
354. Oteo, J., et al., *Emergence of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(2):317-21.
355. Lauderdale, T.L., et al., *KPC-2-producing sequence type 11 Klebsiella pneumoniae detected in Taiwan*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(4):2207-8.
356. Weese, J.S., et al., *Cluster of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in a small animal intensive care unit*. J Am Vet Med Assoc, 2007. **231**(9):1361-4.
357. Peirano, G., et al., *Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(5):1575-81.
358. Anonymous *Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8, Nosokomiale Infektionen*. 2002.
359. Kola, A., et al., *An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing Klebsiella pneumonia associated to duodenoscopy*. Antimicrob Resist Infect Control, 2015. **4**:8.
360. Poirel, L., Bontron, S., Nordmann, P., *In vitro prediction of OXA-48 evolution toward ceftazidime hydrolysis*, in ECCMID 2016. 2016: Niederlande.
361. Taur, Y. and E.G. Pamer, *The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients*. Curr Opin Infect Dis, 2013. **26**(4):332-7.
362. Zordan, S., et al., *Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in veterinary clinics, Germany*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(9):1751-4.
363. Stull, J.W. and J.S. Weese, *Hospital-associated infections in small animal practice*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2015. **45**(2):217-33, v.

364. Nicolle, L.E., *Catheter associated urinary tract infections*. Antimicrob Resist Infect Control, 2014. **3**:23.
365. Septimus, E.J. and J. Moody, *Prevention of Device-Related Healthcare-Associated Infections*. F1000Res, 2016. **5**.
366. Aumeran, C., et al., *Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae outbreak after endoscopic retrograde cholangiopancreatography*. Endoscopy, 2010. **42**(11):895-9.
367. Epstein, L., et al., *New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant Escherichia coli associated with exposure to duodenoscopes*. JAMA, 2014. **312**(14):1447-55.
368. Naas, T., et al., *Endoscopy-associated transmission of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing KPC-2 beta-lactamase*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(6):1305-6.
369. Pardon, B., et al., *Nosocomial Intravascular Catheter Infections with Extended-spectrum Beta-lactamase-producing Escherichia coli in Calves after Strain Introduction from a Commercial Herd*. Transbound Emerg Dis, 2015.
370. Francey, T., et al., *The role of Acinetobacter baumannii as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit*. J Vet Intern Med, 2000. **14**(2):177-83.
371. Poirel, L., et al., *The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(7):2007-8.
372. Dautzenberg, M.J., et al., *Epidemic potential of Escherichia coli ST131 and Klebsiella pneumoniae ST258: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open, 2016. **6**(3):e009971.
373. Walther, B., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations*. Vet Microbiol, 2008. **127**(1-2):171-8.
374. Walther, B., et al., *Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant E. coli, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2014. **127**(11-12):421-7.
375. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann, *OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7):1597-606.
376. Berger, S., et al., *Characterization of a new blaOXA-48-carrying plasmid in Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(8):4064-7.
377. Cottell, J.L., M.A. Webber, and L.J. Piddock, *Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(9):4703-6.
378. Pakpour, S., S. Jabaji, and M.R. Chenier, *Frequency of antibiotic resistance in a swine facility 2.5 years after a ban on antibiotics*. Microb Ecol, 2012. **63**(1):41-50.
379. Sahly, H., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9):3029-34.
380. Shin, J. and K.S. Ko, *Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of Escherichia coli ST131 isolates*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **46**(2):214-8.
381. Shin, J. and K.S. Ko, *Comparative study of genotype and virulence in CTX-M-producing and non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4):2463-7.
382. Nucleo, E., et al., *Differences in biofilm formation and aggregative adherence between beta-lactam susceptible and beta-lactamases producing P. mirabilis clinical isolates*. New Microbiol, 2010. **33**(1):37-45.
383. Yang, D. and Z. Zhang, *Biofilm-forming Klebsiella pneumoniae strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases*. J Hosp Infect, 2008. **68**(4):369-71.
384. Schaufli, K., et al., *Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic E. coli Lineages*. Front Microbiol, 2016. **7**:336.



385. Kim, H.B., et al., *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2):639-45.
386. Cavaco, L.M., et al., *qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2):603-8.
387. Robicsek, A., et al., *qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(8):2872-4.
388. Park, C.H., et al., *Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(11):3953-5.
389. Büchter, B., *Vorkommen und Charakterisierung von Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden Escherichia coli bei Lebensmittel liefernden Tieren; Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin* 2010. ISBN:978-3-86664-874-6
390. Xu, L., et al., *Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 12):1183-7.
391. Coque, T.M., et al., *Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000)*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(2):500-10.
392. Grimm, V., et al., *Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance* (vol 42, pg 3766, 2004). Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(10):4918-4918.
393. Bert, F., C. Branger, and N. Lambert-Zechovsky, *Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. **50**(1):11-18.
394. Grobner, S., et al., *Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates at the university hospital of Tübingen, Germany*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 7):912-22.
395. Pfeifer, Y., et al., *Molecular characterization of blaNDM-1 in an Acinetobacter baumannii strain isolated in Germany in 2007*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(9):1998-2001.
396. Perez-Perez, F.J. and N.D. Hanson, *Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(6):2153-2162.
397. Gregersen, R.H., et al., *Impact of Escherichia coli vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of E. coli in vaccinated flocks*. Avian Pathol, 2010. **39**(4):287-95.
398. Lescat, M., et al., *Commensal Escherichia coli strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure*. Environ Microbiol Rep, 2013. **5**(1):49-57.
399. Johnson, J.R. and A.L. Stell, *Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise*. J Infect Dis, 2000. **181**(1):261-72.
400. Schubert, S., et al., *Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans*. Infect Immun, 1998. **66**(2):480-5.
401. Janben, T., et al., *Virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis*. Int J Med Microbiol, 2001. **291**(5):371-8.
402. Ewers, C., et al., *Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry*. Vet Microbiol, 2004. **104**(1-2):91-101.
403. Maurer, J.J., et al., *The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian Escherichia coli*. Avian Dis, 1998. **42**(1):106-18.

404. Muller, D., et al., *Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(10):3380-90.
405. Bingen, E., et al., *Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains*. J Infect Dis, 1998. **177**(3):642-50.
406. Ewers, C. *Phylogenetische Untersuchungen extraintestinal pathogener Escherichia coli (EXPEC) von Tier und Mensch als Grundlage zur Bewertung der Virulenz, klinischen Bedeutung und des Zoonosepotentials aviärer pathogener E. coli (APEC)*; Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin 2012.
407. Johnson, T.J., et al., *DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains*. J Bacteriol, 2006. **188**(2):745-58.
408. Rodriguez-Siek, K.E., et al., *Characterizing the APEC pathotype*. Vet Res, 2005. **36**(2):241-56.
409. Casey, T.A. and B.T. Bosworth, *Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with Escherichia coli that cause diarrhea and edema disease in swine*. J Vet Diagn Invest, 2009. **21**(1):25-30.
410. Antao, E.M., et al., *Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic Escherichia coli fimbrial adhesin*. PLoS One, 2009. **4**(11):e7796.

## IX Anhang

### 1 Übersicht über verwendete Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 37: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	6752.1
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	822251
Acridinorange	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	318337
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf	11404
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt	1012170100
Amoxicillin/Clavulansäure (20 µg/10 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT0223B
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	A9518
Bacto-Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	211705
Basisfuchsin	Oxoid GmbH, Wesel	BR0050A
Blutagar	Merck KGaA, Darmstadt	1108860500
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt	11001651000
Brain Heart Infusion	Oxoid GmbH, Wesel	CM1135
BseGI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0872
Cefotaxim (30 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT0166B
Cefotaxim (Pulver)	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	C7912-1G
Cefotaxim/Clavulansäure (30 µg/10 µg)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	231752
Cefquinom (30 µg)	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113154
Ceftazidim (30 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT0412B
Ceftazidim/Clavulansäure (30 µg/10 µg)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	231754
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt	1024451000
Ciprofloxacin (5 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT0425B
Coomassie-Brillant-Blue G250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	9598.1
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	23262
DreamTaq Green DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	EP0712
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11278
Eisensulfat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	P015.1
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	3738.2
Endoagar	Oxoid GmbH, Wesel	CM0479
Enrofloxacin (5 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT0639B
Ertapenem (10 µg)	Oxoid GmbH, Wesel	CT1761B
Etest Imipenem	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen	412374

Fortsetzung Tabelle 37

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>Ethanol, absolut</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1009831011
<b>Ethidiumbromid 1 %ige Lösung</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
<b>Ficoll 400 BioChemica</b>	PanReac AppliChem, Darmstadt	A2252.0052
<b>Gassner-Agar</b>	Oxoid GmbH, Wesel	GFG01B
<b>Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder</b>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0241
<b>Glucose-Monohydrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1040741000
<b>Glycerol</b>	Merck KGaA, Darmstadt	8187091000
<b>Gold Agarose</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	850152
<b>HCl</b>	Merck KGaA, Darmstadt	109060
<b>Hefe-Extrakt</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1037530500
<b>Imipenem (10 µg)</b>	Oxoid GmbH, Wesel	CT0455B
<b>Kaliumchlorid</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1048170250
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck KGaA, Darmstadt	51011000
<b>Kaliumhydroxid</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1050331000
<b>Kristallviolett</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1014080025
<b>MacConkey-Agar</b>	Oxoid GmbH, Wesel	CM0007
<b>Magnesiumsulfat</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	0261.1
<b>Master Pure DNA Blut Kit</b>	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf	160571
<b>Meropenem (10 µg)</b>	Oxoid GmbH, Wesel	CT0774B
<b>Methanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1060096025
<b>Midrange PFG Marker I</b>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main	N3551S
<b>Müller-Hinton-Agar</b>	Oxoid GmbH, Wesel	CM337
<b>Natriumazid</b>	Merck KGaA, Darmstadt	8223350100
<b>Natriumchlorid</b>	Merck KGaA, Darmstadt	116224500
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Merck KGaA, Darmstadt	63451000
<b>Natrium-EDTA</b>	Merck KGaA, Darmstadt	159294
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1064981000
<b>Nucleotide, dNTP</b>	PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	PAN 739026
<b>PCR based replicon typing (PBRT Kit)</b>	Diatheva, Fano, IT	MBK0038
<b>Phenol</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	38.2
<b>Pradofloxacin (5 µg)</b>	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	
<b>Proteinase K</b>	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	P6556
<b>Pulse Field Certified Agarose</b>	BIO-RAD Laboratories GmbH, München	1620137
<b>S1 Nuclease</b>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	EN0321
<b>Schafblut, defibriniert</b>	Fiebig-Nährstofftechnik, Idstein	10000500
<b>Sodium N-laurylsarcosinate</b>	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	61743
<b>Spanagar</b>	Carroux (ORT)	MA6861
<b>Standard I Nährbouillon</b>	Merck KGaA, Darmstadt	1078820500

Fortsetzung Tabelle 37

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
<b>Tango Buffer (10x)</b>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	BY5
<b>Thioharnstoff</b>	Fluka Biochemca, Zwijndrecht, NL	88810
<b>Tris</b>	Calbiochem, Darmstadt	648309
<b>Tris ( Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	4855.2
<b>Xbal</b>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0681
<b>Xylene Cyanol FF</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	38505

**Tabelle 38: Verwendete Geräte und Softwareprogramme**

Gerät/Modell	Firma
<b>Bilddokumentationssystem E.A.S.Y B-1393-347C</b>	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
<b>BioNumerics version 6.6-Software</b>	Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien
<b>BIO-RAD CHEF Mapper und Variable Speed Pump</b>	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
<b>Brutschränke</b>	Heraeus Instruments, Hanau; Binder GmbH, Tuttlingen
<b>Bunsenbrenner</b>	Schütt, Göttingen
<b>Disk Dispenser</b>	Oxoid GmbH, Wesel
<b>Eismaschine Scotsman AF 80 AS</b>	Über MAGV GmbH, Rabenau-Loendorf
<b>Elektrophoresekammer für Agarosegele (60 ml)</b>	HYBAID GmbH, Heidelberg
<b>Feinwaage AE 163</b>	Mettler-Waagen, Gießen
<b>Feinwaage EW600-2M</b>	Kern, Albstadt
<b>Gefrierschrank -20°C GSD2614/01</b>	Bosch, Jungingen
<b>Gefrierschrank -70°C HU 9-50 V-T-A</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
<b>Gel-Electrophoresis Apparatus GNA-200 (Plasmidpräp)</b>	Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL
<b>Gelgießstand und Kamm für PCR</b>	HYBAID GmbH, Heidelberg
<b>Gelgießstand und Kamm für PFGE</b>	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
<b>Heiz- und Magnetrührer</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>Horizontalschüttler Titramax 100</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
<b>IBM SPSS Statistics, Version 22</b>	IBM, Armonk, USA
<b>Kühlung Colora</b>	Messtechnik Lorch
<b>Mehrkanalpipette Biohit elektrisch, 10-300 µl</b>	Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v.d. Höhe
<b>Microplate-Reader Infinite® F50/Robotic</b>	Tecan, Männedorf, Schweiz
<b>Mikrowellengerät</b>	Durabrand
<b>NanoDrop 2000c</b>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Oberkopfschüttler</b>	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
<b>Photometer DU® 640</b>	Beckman Instruments, München

Fortsetzung Tabelle 38

Gerät/Modell	Firma
Pipetten, Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Ridom SeqSphere+ Software, Version 1.0.1	Ridom GmbH, Münster
Spannungsgerät Gene Power Supply GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL
SPSS	IBM, Armonk; USA
Stereomikroskop SZX2	Olympus, Hamburg
Sterilbank Laminar HB 2472	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, über MAGV, Rabenau-Lohndorf
TProfessional Trio Thermocycler	Biometra über Analytik Jena AG, Jena
Überkopfschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Universalschüttler SM 30 A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
VITEK 2-System	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Vortex Type RFAX 1R	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Medizin und Labortechnik H. Kretschmer, Gießen

Tabelle 39: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle	Artikelnummer
8er Deckelkette	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	65989002
96-Well Multiply-PCR Plate	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	72985
Blotting-Papier MN 218 B	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 52313 Düren	742113
Disposable Plug Mold (Gießförmchen)	BIO-RAD Laboratories GmbH, München	170-3713
Einmal-Küvetten (1,5 ml, halbmikro)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	759015
Einmal-Ösen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	731170
Folie als Abdichtung für Mikrotiterplatten	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	T093.1
Gramnegative Resistenztestkarte AST-GN38	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen	22331
Multiply-Pro Gefäß	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	72737002
Parafilm	über MAGV, Rabenau	31011
Pipettenpitzen 1000 µl, blau	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	70762
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	70760002
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	701116
Pipettenspitzen für Mehrkanalpipette, 350 µl	Sartorius AG, Göttingen	790354
Plattierungsspatel	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	861569005

Fortsetzung Tabelle 39

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-nummer
<b>Reagiergefäß 1,5 ml</b>	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	72690550
<b>Reagiergefäß 2,0 ml</b>	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht	72691
<b>Rotilabo-Microtest-Platte, F-Profil</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	9293.1
<b>Safe lock Tubes</b>	Eppendorf AG, Hamburg, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	30120086
<b>Sterile Kryoröhrchen</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	122263
<b>Wattetupfer, steril</b>	Applimed SA, Châtel-Saint-Denis, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	1102257

## 2 Verwendete Puffer und Lösungen

### Elektrophorese-Gebrauchslösung (1xTAE)

Elektrophorese-Stammlösung (50x TAE) 200 ml  
*A. dest.* 10 l

### Elektrophorese-Stammlösung (50xTAE)

1 M Tris-HCl 242 g  
 Eisessig 57,1 g  
 0,5 M Na<sub>2</sub>-EDTA x 2H<sub>2</sub>O pH 8 100 ml  
*A. dest.* ad 1000 ml

### 0,5 M Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösung (pH 8,0)

Na<sub>2</sub>-EDTA 186,15 g  
*A. dest.* ad 1000 ml  
 NaOH ad pH 8,0

### Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid 100 µl  
*A. dest.* ad 1 ml

### PBS (10x, pH 7,0)

NaCl 80 g  
 KCl 2 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 g  
*A. dest.* ad 1000 ml  
 HCl ad pH 7,0

### PBS (1x)

10x PBS 100 ml  
*A. dest.* ad 1000 ml

### ESP-Puffer

500 mM EDTA 18,61 g  
 1 % Lauroylsarkosin 1 g  
 4 N NaOH ad pH 9,5  
*A. dest.* ad 100 ml

**500 mM EDTA pH 8,0**

EDTA	186,15 g
NaOH	ad pH 8,0
A. dest.	ad 1000 ml

**TE-Puffer**

10 mM Tris	1,21 g
10 mM EDTA	3,72 g
pH auf 7,5	
A. dest.	ad 1000 ml

**TBE-Puffer (10x)**

890 mM Tris	107,815 g
890 mM Borsäure	40 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**TBE-Puffer (1x)**

TBE (10x)	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**0,5x TBE + Thioharnstoff**

TBE (10x)	125 ml
Thioharnstoff	18,75 mg
A. dest.	ad 2500 ml

**1 M Magnesiumsulfat**

Magnesiumsulfat	6,02 g
A. dest.	ad 50 ml

**Ethanol-Aceton-Gemisch (80:20)**

Ethanol	400 ml
Aceton	100 ml

**0,1 %ige Kristallviolettlösung**

Kristallviolett	0,5 g
A. dest.	ad 500 ml

**10 mM Eisensulfat**

Eisensulfat	139 mg
A. dest.	ad 50 ml

**Acridinorangelösung**

Acridinorange	0,1 g
Ethanol	25 ml
A. dest.	75 ml

**Cell Suspensions Puffer (CSP)**

100 mM Tris	100 ml
100 mM EDTA	200 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**Lysepuffer für S1-Nuclease-Verdau**

1M Tris, pH 8,0	25 ml
0,5M EDTA, pH 8,0	50 ml
Sodium N-laurylsarcosinate	5 g
A. dest.	ad 500 ml



**10 %ige Basisfuchsinlösung**

Basisfuchsin	10 g
<i>A. dest.</i>	100 ml

**Lysepuffer für Plasmidpräparation**

SDS, 10 %ig	1,5 ml
250 mM Tris (ungepuffert)	1 ml
5N NaOH	0,75 ml
<i>A. dest.</i>	2,375 ml

**SDS, 10 %ig**

SDS	100 g
<i>A. dest.</i>	900 ml
0,1 N HCl	ad pH 7,2

**NaOH, 5N**

NaOH	200 g
<i>A. dest.</i>	1000 ml

**250 mM Tris, ungepuffert**

Tris	3,03 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

**6x Gel loading buffer**

Xylene Cyanole FF	0,25 g
Ficoll	1,5 g
<i>A. dest.</i>	9,5 ml

**MIX 20**

<i>A. dest.</i>	1150 µl
10x Dream Taq Green Buffer	150 µl
dNTPs	20 µl

### 3 Verwendete Nährmedien

**Blutagar**

Blutagar	50 g
Schafblut, defibriniert	50 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**Gassner-Agar**

Gassner-Agar	77 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**„ESBL-Agar“**

MacConkey-Agar	52 g
Cefotaxim	1 mg
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**MH-Agar**

Müller-Hinton-Agar	38 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**NB-I-Medium**

Standard-I-Nährbouillon	25 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**Endoagar mit Natriumazid und Cefotaxim**

Endoagar	36 g
10 %ige Basisfuchsinlösung	5 ml
Cefotaxim	4 mg
Natrimazid	100 mg
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**Endoagar mit Natriumazid und Ampicillin**

Endoagar	36 g
10 %ige Basisfuchsinlösung	5 ml
Ampicillin	50 mg
Natrimazid	100 mg
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**BHI-Medium**

Brain Heart Infusion	37 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**BHI-Medium mit 60 % Glycerin**

Brain Heart Infusion	37 g
Glycerol	600 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**LB-Medium**

NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
Bacto-Trypton	10 g
NaOH	4 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**M63-Medium**

15 mM Ammoniumsulfat	2 g
100 mM Kaliumphosphat	13,6 g
1,7 µM Eisensulfat	0,5 mg
1M Magnesiumsulfat	1 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
KOH	pH 7,0

**Spanagar ohne NaCl**

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Spanagar	18 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

**Spanagar mit NaCl**

s.o. + NaCl	5 g
-------------	-----

4 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Tabelle 40: Verwendete Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von ESBL-, AmpC-, Carbapenemase- und FQ-Resistenzgenen

Primername	Sequenz	Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
qnrC- F	GGTTGTACATTATTGAATCG	qnrC-Nachweis	FQR-II-MP	307	[385]
qnrC- R	CACCTACCCATTATTITCA				
oqxB- F	TTCTCCCGCGGGGAAGTAC	oqxB-Nachweis	FQR-II-MP	513	[385]
oqxB- R	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA				
oqxA- F	CTCGGCGGATGATGCT	oqxA-Nachweis	FQR-I-MP	400	[385]
oqxA- R	CCACTCTTCACGGGAGACGA				
qnrD- F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	qnrD-Nachweis	FQR-I-MP	582	[386]
qnrD- R	AACAAGCTGAAGCGCTG				
qnrA- F	ATTCTCAGCCAGGATTTG	qnrA-Nachweis	qnrA/B/S-MP	516	[387]
qnrA- R	GATCGGCAAAAGGTAGGTCA				
qnrB- F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	qnrB-Nachweis	qnrA/B/S-MP	469	[387]
qnrB- R	ACGATGCCCTGGTAGTTGCC				
qnrS- F	ACGACATTTCGTCAACTGCAA	qnrS-Nachweis	qnrA/B/S-MP	417	[387]
qnrS- R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC				
aac(6)-Ib- F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	aac(6')-Ib-Nachweis	aac(6')-Ib-Monoplex	482	[388]
aac(6)-Ib- R	CTCGAATGCCTGGCGTGT				
M13U CTX-M 1F	GGTAAAAATCACTGCG	bla <sub>CTX-M</sub> Gruppe 1-Sequenzanalyse	„CTX-M-kurz/lang“	600	[389]
CTX-MR2	GCTAAGCTCAGCCAGTGACAT				
CTX-M R Endseq.	GAGCTTAGCCCTGGTAT	bla <sub>CTX-M</sub> Gruppe 1-Sequenzanalyse	„CTX-M-kurz“	600	[389]
CTX-M7 F	GCGTGATACCACTTCACCTC				
CTX-M8 R	TGAAGTAAGTACCAGAATC	bla <sub>CTX-M</sub> -Gruppe 1-Nachweis	CTX-M Gruppe 1	260	[390]
CTX-M17 F	TGATACCACCACGCCGTC	bla <sub>CTX-M</sub> -Gruppe 2'-Nachweis	CTX-M Gruppe 2	341	[390]
CTX-M18 R	TATTGCATCAGAAACCCGTGGG				
CTX-M11 F	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA	bla <sub>CTX-M</sub> Gruppe 9-Nachweis	CTX-M Gruppe 9	293	[390]
CTX-M12 R	GTAAGCTGACGCACACGCTCTGC				
CTX-M19 F	CAATCTGACGTTGGGCAATG	bla <sub>CTX-M</sub> -Gruppe 8/125/26'-Nachweis	CTX-M Gruppe 8, 25/26	207	[390]
CTX-M20 R	ATAACCCGCGGTGACAAAT				

Fortsetzung Tabelle 40

Primername	Sequenz	Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
CTX-M Gr9 fw	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	<i>bla</i> <sub>CTX-M-Gruppe 9</sub> Sequenzanalyse	CTX-M-Gruppe-9 Sequenzierung	900	[391]
CTX-M Gr9 rev	GGCTTTCAGCGCGAGAAATCAT				
<i>bla</i> SHV fw	GGGTATTCTTATTATTGTGCG	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> -Nachweis	SHV-Monoplex	930	[391]
<i>bla</i> SHV rev	TTAGCGTTGCCAGTGCTC				
TEM Grimm fwd	ATGAGTATTCAAACATTTCCG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> -Nachweis	TEM-Monoplex	800	[392]
TEM Grimm rev	TTAATCAGTAGGCAACTAT				
<i>bla</i> OXA1-F	TTTTCTGTTGTTGGGTTTC	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gruppe 1-Nachweis	OXA-Gruppen-MP	427	[393]
<i>bla</i> OXA1-R	TTTCTTGGCTTTTATGCTTG				
<i>bla</i> OXA2-F	AAGAAACGCTACTGCTCTGC	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gruppe 2'-Nachweis	OXA-Gruppen-MP	478	[393]
<i>bla</i> OXA2-R	CCACTCAACCCATCCTAACC				
<i>bla</i> OXA10-F	TCAACAAATCGCAGAGAAAG	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gruppe-10'-Nachweis	OXA-Gruppen-MP	272	[393]
<i>bla</i> OXA10-R	TCCCACACCCAGAAAAACCAG				
PER_FWD	CCTGACGATCTGGAACCTTT	<i>bla</i> <sub>PER</sub> -Nachweis	PER-Monoplex	636	Persönliche Mitteilung Dr. Pfeifer, RKI, Wennigerode
PER_REV	TCCATCAGGCAACAGAAATGA				
VEB_Fwd	TACCCCTCAAGACCTTTTTC	<i>bla</i> <sub>VEB</sub> -Nachweis	VEB- Monoplex	441	Persönliche Mitteilung Dr. Pfeifer, RKI, Wennigerode
VEB_Rev	CCGGAAGTCCTGTTTTATG				
OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> like Gene-Nachweis	Carbapenemasen-MP	743	[349]
OXA-48B	GAGCAGCTCTTTTGTGATGGC				
KPC_F	GAGCTCATTCGAAGGCTTTC	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -Nachweis	Carbapenemasen-MP	533	[394]
KPC_R	AGTCATTTGCCGTGCCATAC				
VIM_F	AGTGGTGAGTATCCGACAG	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> -Nachweis	Carbapenemasen-MP	261	[394]
VIM_R	ATGAAAGTGGCTGGAGAC				
NDM-1_F	CTGAGCACGCGCATTAGCC	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> -Nachweis	Carbapenemasen-MP	754	[395]
NDM-1_R	GGCCCGTATGAGTGATTGC				
ACCM_F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	<i>bla</i> <sub>ACC</sub> -Nachweis	AmpC-MP	346	[396]
ACCM_R	TTCCGCCGAATCATCCCTAGC				
EBCM_F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	<i>bla</i> <sub>EBC</sub> -Nachweis	AmpC-MP	302	[396]
EBCM_R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT				
FOX_M_F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	<i>bla</i> <sub>FOX</sub> Nachweis	AmpC-MP	190	[396]
FOX_M_R	CAAAAGCGGTAACCGGATTGG				

Fortsetzung Tabelle 40

Primername	Sequenz	Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
AmpC-Prom._FP	CTACGGTCTGGCTGCTA	Sequenzierung AmpC- Promotor-Bereich	AmpC-Promotor	169	Persönliche Mitteilung Dr. Y. Pfeifer, RKI Wernigerode
AmpC-Prom._RP	TGGAGCAAGAGCGGTA				

Tabelle 41: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die *E. coli*- und *K. pneumoniae*-MLST

Primername	Sequenz (5' - 3')	MLST	Produkt (bp)	Referenz
adk_F1	TCATCATCTGCACATTCCGC	<i>E. coli</i>	766	http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColp_html
adk_R1	CCAGATCAGCGGAACTTCA			
fumC_P1	TCACAGGTCCGACGGCTTC	<i>E. coli</i>	806	[244]
fumC_P2	GTACGCGACGAAAAGATTG			
gyrB_seq F	CACCAATTCACGCCGATACT	<i>E. coli</i>	776	[397]
gyrB-P2	ATCAGGCCCTTCACGCGCATC			[244]
lcd_FP	CGATTATCCCTTACATTGAAG	<i>E. coli</i>	800	http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html
lcd_P2	GGACGCAGCAGATCTGTT			[244]
mdh_F1	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	<i>E. coli</i>	932	http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html
mdh_R1	CAGGTTCAAGAACTCTCTCTGT			
purA_FP2	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	<i>E. coli</i>	816	[244]
purA_RP	CATACGGTAAGCCACGCGAGA			
rpoB-F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	<i>K. pneumoniae</i>	501	[214]
rpoB-R	GAGTCTCGAAGTTGTGTAACC			
mdh-F	CCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	<i>K. pneumoniae</i>	477	[214]
mdh-R	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG			
pgi-F	CGGCCACGCTTTATAGCGGTTA	<i>K. pneumoniae</i>	432	[214]
pgi-R	GAGAAAACCTGCCTGTACTGCT			
phoE-F	ACCTACCGCAACCCGACTTCTT	<i>K. pneumoniae</i>	420	[214]
phoE-R	TGATCAGAAGCTGTAGGTGAT			
infB-F	CTCGCTGCTGGACTATATTCC	<i>K. pneumoniae</i>	318	[214]
infB-R	CGCTTCAGCTAAGAACTTC			
tonB-F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGT	<i>K. pneumoniae</i>	414	[214]
tonB-2R	ATTCGCCGCTGRGCRGAGAG			

**Tabelle 42: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die erweiterte Quadruplex-PCR nach Clermont und die Gruppe-C- bzw. Gruppe-E-Detektions-PCR modifiziert nach Clermont [138]**

Primername	Sequenz	PCR	Produkt (bp)	Referenz
chuA_1b	ATGTTACCGGAGCAACCAAC	Quadruplex-PCR	288	[137, 138]
chuA_2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA_1b	CAACGTTGAAGTGTACAGGAG	Quadruplex-PCR	211	[138]
yjaA_2b	AATGGCTTCCTCAACCTGTG			
TspE4C2.1b	CACTATTCTGAAGTTCATCC	Quadruplex-PCR	152	[138]
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
AceK.f	AACGCTATTGCCAGCTTGC	Quadruplex-PCR	400	[137, 138]
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
ArpAfpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	Gruppe E-Detektions-PCR	301	[398]
ArpAfpE.r	GAAAGAAAAGAAATCCCAGAG			
trpAfpC.1	AGTTTATGCCCAGTGGCAG	Gruppe C-Detektions-PCR	219	[398]
trpAfpC.2	TCTGCCCGGTCACGCC			

**Tabelle 43: Verwendete Oligonukleotid-Primer zum Nachweis konservierter Genregionen auf dem OXA-48-Plasmid**

Primername	Sequenz	Funktion	Produkt (bp)	Referenz
traU-A	ATCTCACGCAATCTTACGTC	konservierte <i>traU</i> -Region	OXA-48-Plasmid	925 [132]
traU-B	TCGCGTCATGCGTGATCTTC			
rep-A	GACATTGAGTCAGTAGAAGG	konservierte <i>repA</i> -Region	OXA-48-Plasmid	577 [132]
rep-B	CGTGCAgTTCGTCTTTGGGC			
parA-A	GCAGTGAaAACGTTGATCAG	konservierte <i>parA</i> -Region	OXA-48-Plasmid	532 [132]
parA-B	GATCGCAATCGCTCTTGGTG			

Tabelle 44: Verwendete Oligonukleotid-Primer Multiplex-PCR I-IX zum Nachweis virulenzassoziiierter Gene bei *E. coli*

Primername	Sequenz	Gen-Nachweis	Produkt/ biologische Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
kpsMT K1 FP	CATCAGACGATAAGCATGAGCA					
kpsMT K1 RP	GCGCATTTCGTGATACTGTT	<i>kpsMTII</i>	Gruppe B Kapsel-Synthese	MP-I	250	[399]
hlyA FP	GTCATTGCCGATAAGTTT					
hlyA RP	AAGTAAATTTTGGCGTGTTT	<i>hlyA</i>	Alpha-Hämolysin	MP-I	352	[156]
pic-FP	ACTGGATCTTAAGGCTGCAGG					
pic-RP	TGGAATATCAGGGTGCCACT	<i>pic</i>	Serin-Protease Autotransporter	MP-I	412	[156]
fimC (FP)	GGGTAGAAATGCCGATGGTG					
fimC (RP)	CGTCATTTCGGGGTAAGTGC	<i>fimC</i>	Typ 1-Fimbrie	MP-I	477	[156]
hra1 RP(742)	GTACTCACACTGCTGTACCT					
hra1 FP(203)	TCACTTGACAGACCAGCGTTTC	<i>hra</i>	Hitzeresistentes Agglutinin	MP-I	537	[156]
neuC FP	GGTGTACATTCCGGGATGTC					
neuC RP	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	<i>neuC</i>	K1-Kapsel-Synthese	MP-I	676	[156]
RP <i>AI</i> (malX) FP	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA					
RP <i>AI</i> (malX) RP	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	<i>malX</i>	Zucker-Transporter PAI-Marker	MP-I	922	[399]
sfa(CFT) FP	CGGAGAACTGGTGTCATCTTA					
focD(CFT) RP	GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA	<i>sfa/foc</i>	S-Fimbrien-Adhäsion und F1C-Fimbrie	MP-I	1242	[156]
chuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT					
chuA.2	TGCCGCGAGTACCAAAGACA	<i>chuA</i>	„ <i>E. coli</i> / haem utilization“ (Hämin Rezeptor)	MP-II	278	[137]
ibeA FP (14)	TGGACCCGCTCGTAATATAC					
ibeA RP(355)	TGCGCTGTTCAAGCATTTGCA	<i>ibeA</i>	„Invasion of brain endothelium“ (Invasionsprotein)	MP-II	342	[156]
traT FP	CTGCCTGTTCAGGCATTGCA					
traT RP	TAGTTACATCTTCACCACATCG	<i>traT</i>	Transfer-Oberflächen Exklusionsprotein	MP-II	430	[156]
siID(ep) FP(846)	ACTCCATACACAGGATCTCG					
siID(ep) RP(122)	CTGTCGTGTCCGGAATGA	<i>siID</i> (epi-somal)	Salmonella Eisen-Transport-System	MP-II	554	[156]
gimBFP(336)	TCCAGATTGAGCATATCCC					
gimBFP(1071)	CCTGAACATGTTGGCTTCA	<i>gimB</i>	Genetische Insel assoziiert mit Meningitis	MP-II	736	[156]
siID (chro) FP	ACTCCATACACAGGATCTG					
siID (chro) RP	CTGTCTGTGTCGGGAATGA	<i>siID</i> (chromosomal)	Salmonella Eisen-Transport-System (chromosomal)	MP-II	1052	[156]

Fortsetzung Tabelle 44

Primername	Sequenz	Gen-Nachweis	Produkt/ biologische Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
astA FP	TGCCATCAACACAGTATATCC	astA	EAST1 (Hitzestabiles Zytotoxin)	MP-III	116	[156]
astA RP	TAGGATCCTCAGGTCGAGTGACGCGC					
ISS-FP1 MP	ATCACATAGGATTCTGCGC	iss	"Increased serum survival" (Serumresistenz)	MP-III	309	[156]
ISS-RP1 MP	CAGCGGAGTATAGATGCCA					
irp-2 FP/ HMWP-2s	AAGGATTCTGCTGTTACCGGAC	irp2	"Iron repressible protein" (Yersiniabaktin-Synthese)	MP-III	413	[400]
irp2-RP-MP	AACTCCTGATACAGGTGGC					
papC (FP)	TGATATCACGCGAGTCAGTAGC	papC	P-Fimbrie	MP-III	501	[401]
papC (RP)	CCGGCCATATTCAACATAAC					
ColV FP	TCCAAGCGGACCCCTTATAG	colV	ColV-Plasmid-Strukturprotein	MP-III	598	[156]
ColV RP	CGCAGCATAGTTCCATGCT					
aerAfp	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	iucD	Aerobaktin/Iron uptake chelator" (Siderophor-Synthese)	MP-III	714	[401]
aerarp	CCTGATCCAGATGATGCTC					
tsh FP (132)	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	tsh	Temperatur-sensitives Hämagglutinin	MP-III	824	[402]
tsh RP (955)	CTTCCGATGTTCTGAACGT					
vat-FP	TCCTGGGACATAATGGTCAG	vat	Vakuolierendes Autotransporter-Toxin	MP-III	981	[402]
vat-RP	GTGTCAAGACGGAAATTGTC					
csgA FP	ACTCTGACTTGACTATTACC	csgA	Curli-Fimbrien	MP-IV	250	[403]
csgA RP	AGATCGAGTCTGGTCAAC					
ireA FP	ATTGCGTGATGTGTTCTGC	ireA	"Iron regulated element" (Siderophor-Rezeptor)	MP-IV	384	[156]
ireA RP	CACGGATCACTTCAATTGCGT					
CNF1/2 FP	TCGTTATAAATCAACACAGTG	cnf1/2	Zytotoxischer Nekrosefaktor 1 und 2	MP-IV	446	[402]
CNF1/2 RP	CTTTACAATAATTGACATGCTG					
tia FP	AGCGCTTCCGTCAGGACTT	tia	"Toxicogen invasion locus"	MP-IV	512	[156]
tia RP	ACCAGCATCCAGATAGCGAT					
sat-toxinFP1	GCTGGCTCTGGAGGAAC	sat	Sezerniertes Autotransporter-Toxin	MP-IV	667	[156]
sat-toxinRP1	TTGAACATTCAGAGTACCCGG					
fyuA FP	GCGACGGGAACCGATGACTTA	fyuA	"Ferric yersinia uptake" (Yersiniabaktin-Rezeptor)	MP-IV	775	[400]
fyuA RP	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA					



Fortsetzung Tabelle 44

Primername	Sequenz	Gen-Nachweis	Produkt/ biologische Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
mat FP	TATACGCTGGACTGAGTCGTG	<i>mat</i>	Meningitis assoziierte, Temperatur-regulierte Fimbrie	MP-IV	899	[156]
mat RP	CAGGTAGCGTCGAACTGTA					
feoB (1113)	TGAGGACTCCGGCTATATGG	<i>feoB</i>	„Ferrous iron transport system“	MP-IV	1095	[156]
feoB (2207)	ATAACTGCCAGAAATGCACACC					
MP4-sx1A-F	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	<i>stx1</i>	Shigatoxin 1	MP-V	244	[404]
MP4-sx1A-R	AATGCCACGCTCCCAAGAATTG					
MP3-sx2A-F	GTTTTGACCACTCTCGTCTGATTATTGAG	<i>stx2</i>	Shigatoxin 2	MP-V	324	[404]
MP3-sx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC					
MP3-escV-F	ATCTGGCTCTCTTCTCTTTATGGCTG	<i>escV</i>	Typ III-Sekretionssystem	MP-V	544	[404]
MP3-escV-R	CGTCCCGTTTTACAAACTTCATCGC					
MP3-bfpB-F	GACACCTCATTTGCTGAAGTCG	<i>bfpB</i>	Bundle forming Pili	MP-V	910	[404]
MP3-bfpB-R	CCAGAACACCTCCGTTATGC					
Pap A f	ATGGCAGTGGTGTCITTTTGGTG	<i>papAH</i>	P-Fimbrie “major pilins“	MP-VIb	720	[399]
Pap A r	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC					
FocG f	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	<i>focG</i>	F1C-Fimbrie (minor subunit)	MP-VIb	360	[399]
FocG r	GAATGTCGCCTGCCCATTGCT					
gafD-f	TGTTGGACCGCTCTCAGGGCTC	<i>gafD</i>	N-Acetyl-D-Glucosamin-spezifisches fimbriales Lektin	MP-VIb	952	[399]
gafD-r	CTCCGGGAAGCTCGCTGTTACT					
nfaE-f	GCTTACTGATTCTGGGATGGA	<i>nfaE</i>	Nicht-fimbriales Adhäsion	MP-VIb	559	[399]
nfaE-r	CGGTGCGCGAGTCATATGCA					
AerJ f	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG	<i>iutA</i>	“Iron uptake transport“ (Aerobaktin-Rezeptor)	MP-VIb	300	[399]
AerJ r	CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG					
hlyC_FP	AGGTTCTTGGCATGTATCCT	<i>hlyC</i>	Hämolysin C	MP-VIc	556	[405]
hlyC_RP	TGCTTTGCAGACTGGAGTGT					
Pap EF f	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	<i>pap EF</i>	P-Fimbrie “minor pilins“	MP-VIc	336	[399]
Pap EF r	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA					
sfaS f	GTGGATACGACGATTACTGTG	<i>sfaS</i>	S-Fimbrien-Adhäsion (minor subunit)	MP-VIc	240	[399]
sfaS r	CCGCCAGCATTCCTGTATTG					

Fortsetzung Tabelle 44

Primername	Sequenz	Gen-Nachweis	Produkt/ biologische Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
bmaE-f	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	<i>bmaE</i>	Blutgruppen M-spezifisches Adhäsin	MP-Vic	507	[399]
bmaE-r	AGGGGGACATATAGCCCCCTTC					
papGf	CTGTAAATTACGGAAGTATTCTG	<i>pap G</i>	P-Fimbrie Klasse II/III Adhäsın	MP-Vic	1057	[399]
papGr	ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	<i>pap G II,III</i>				
hlyF_FP	ATGGATCCTCGTCTTTGATG	<i>hlyF</i>	Hämolyisin F	MP-VII	250	[406]
hlyF_RP	GCTCATTGCCAGTATGTCA					
ompT-PL_FP	TTGCTAGTGCACCTCTCAGC	<i>omp T</i>	"Outer membrane protein T" (Protease)	MP-VII	610	[406]
ompT-PL_RP	CGACGATACTCTGGGTAACA					
P-pks3	CGCTTCATCAACACGCTTTA	<i>pks</i>	Polyketid-Synthase	MP-VII	300	[406]
P-pks4	CCATCGCTATCACCTCAAC					
puvA_RP	CACACTTGTATAGCAACCCGT	<i>puvA</i>	Virulenz-assoziiert (nicht näher spezifiziert)	MP-VII	521	[406]
puvA_FP	TGCACCTGTCAGATACAGGTG					
ihA (ATG) FP	ATGCGAATAACCAATTTTGGCTTC	<i>ihA</i>	Iron-regulated-gene-homologue adhesion	MP-VII	2100	[406]
ihA (TGA) RP	TCAGAACTGATAGTTACGCGACA					
csgA_FP	ACTCTGACTTGACTATTACC	<i>csgA</i>	Curli-Fimbrien	MP-VII	250	[403]
csgA_RP	AGATGGAGTCTGGTCAAC					
ea/I_FP	ATGCAATGGCAGTACCCTTC	<i>ea/I1</i>	Putatives ExPEC-Adhäsın	MP-VII	761	[406]
ea/I_RP	ATAAACACAAATATGGCGCTCG					
etsB_FP	ACGCCGGTTAATAGTTGGAGATAG	<i>etsB</i>	Eisentransportsystem	MP-IX	450	[407]
etsB_RP	ATCGATAGCGTCAGCCCGGAAGTTAG					
etsC_FP	TGATGCCCCCGCAAACTCAAGA	<i>etsC</i>	Eisentransportsystem	MP-IX	537	[407]
etsC_RP	ATGCGCGGGCCTGACATAAGTGCTAA					
eitA_FP	CAACTGGCGGGGAACGAAATCAGGA	<i>eitA</i>	"E. coli iron transport" (Hämin-Rezeptor)	MP-IX	284	[407]
eitA_RP	TCAGTTCGCGGTGGCAACAACCTAC					
eitC_FP	CAGCAGGCGCTTCGGAACAAATCTCCT	<i>eitC</i>	"E. coli iron transport" (Hämin-Rezeptor)	MP-IX	380	[407]
eitC_RP	TTCCCAACCACTCTCGTTCTCAAC					
sitA_FP	AGGGGGCACAACTGATTCTCG	<i>sitA</i>	Salmonella Eisen-Transport-System (chr./epis.)	MP-IX	608	[408]
sitA_RP	TACCGGGCCGTTTTCTGTGC					

Fortsetzung Tabelle 44

Primername	Sequenz	Gen-Nachweis	Produkt/ biologische Funktion	Name PCR	Produkt (bp)	Referenz
cvaC_FP	CACACACAAACGGGAGCTGTT	coIV	CoIV-Plasmid-Strukturprotein	MP-IX	679	[399]
cvaC_RP	CTTCGGCAGCATAGTTCCAT					

Tabelle 45: Verwendete Oligonukleotid-Primer Bosworth-PCR modifiziert nach Barth [240]

Primername	Sequenz	Produkt/biologische Funktion		Produkt (bp)	Referenz
estb_f	TGCCTATGCATCTACACAAT	Hitzestabiles Enterotoxin ST-II		113	[409]
estb_r	CTCCAGCAGTACCATCTCTA				
estap_f	CAACTGAATCACTTGACTCTT	Hitzestabiles Enterotoxin ST-Ia		158	[409]
estap_2	TTAATAACATCCAGCACAGG				
F5_f	AATACTTGTTACGGGAGAAA	F5-Fimbrien		230	[409]
F5_r	AAC TTGTGGTTAACTTCCT				
elit_f	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	Hitzelabiles Enterotoxin LT-Ib		272	[409]
elit_r	TGGTCTCGGTCAGATATGT				
F18_f	TGGTAACGTATCAGCAACTA	F18ab- und F18fc-Fimbrien		313	[409]
F18_r	ACTTACAGTGCTATTGACG				
F6_f	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	F6-Fimbrien		409	[409]
F6_r	GTAAC TCCACCCGTTTGATC				
F4_f	GTTGGTACAGGCTCTTAATGG	F4-Fimbrien		499	[409]
F4_r	GAATCTGTCCGAGAATATCA				
F41_f	AGTATCTGGTTTCAGTGATGG	F41-Fimbrien		612	[409]
F41_r	CCACTATAAGAGGTTGAAGC				
Six2e_f	AATAGTATACGACAGCGAT	Shiga-Toxin 2e		733	[409]
Six2e_r	TCTGACATTCTGGTTGACTC				
F-EaeA-1	ATATCGGTTTAAATGGCTATCT	Intimin		425	[242]
F-Eae-2	AATCTTCTCGCTACTGTGTCA				

**Tabelle 46: PCR zum Nachweis virulenzassoziierter Gene bei *E. coli*-Isolaten von Rindern modifiziert nach van Bost, Franck und Nguyen [241-243]**

Primername	Sequenz	Produkt/biologische Funktion	Produkt (bp)	Referenz
cnf1/2_for cnf1/2_rev	TTATATAGTCGTC AAGATGGA CACTAAGCTTTACAAATTATTGA	Zytotoxisch nekrotisierender Faktor 1/2	633	[241]
F17_for F17_rev	GCAGAAAATTC AATTATCCTTGG CTGATAAGCGATGGTGAATTAAAC	F17-Fimbrien	537	[241]
F-EaeA-1 F-Eae-2	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	Intimin	425	[242]
F-F41-3 F-F41-4	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	F41-Fimbrien	380	[242]
papC_for papC_rev	GACGGCTGTA CTGACGGGTGTGGCG ATATCCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	P-Fimbrien	328	[241]
VT2_for VT2_rev	ACCGTTTTTTCAGATTTTIRCACATA TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	Shigatoxin Typ 2	298	[243]
lucD_for lucD_rev	AAAAC TGACATCGGATGGC GTATTTGTGGCAACGCAGAA	Aerobactin, Siderophorsynthese	253	[241]
F-STa-1 F-STa-2	GCTAATGTTGGCAATTTTATTTCTGTGA AGGATTACAACAAAAGTTACACAGCAGTAA	Hitzestabiles Enterotoxin ST-I	190	[242]
VT1_for VT1_rev	GGAGAGTCG GTGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAAATAA	Shigatoxin Typ 1	130	[243]

5 Verwendete Kontrollstämme

Tabelle 47: Verwendete Kontrollstämme für die PCRs zur Untersuchung auf Resistenzgene

Eigene Nr.	Originalnummer	Spezies	Herkunft	Kontrolle für den Nachweis von
IHIT31506	IMT20609	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>aac(6')-Ib</i>
IHIT31507	IMT17420	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
IHIT19368	IMT20749	<i>E. cloacae</i>	IMT, Berlin	<i>qnrA</i>
IHIT19326	IMT20750	<i>K. pneumoniae</i>	IMT, Berlin	<i>qnrB</i>
IHIT19369	IMT20751	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>qnrS</i>
IHIT19856		<i>E. coli</i>	National Food Institute and University of Copenhagen	<i>qnrC</i>
IHIT19857		<i>E. coli</i>	National Food Institute and University of Copenhagen	<i>qxqB</i>
IHIT19858		<i>E. coli</i>	National Food Institute and University of Copenhagen	<i>qnrD</i>
IHIT19859		<i>E. coli</i>	National Food Institute and University of Copenhagen	<i>qxqA</i>
IHIT31508	IMT21402	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>blaCTX-M-Gruppe 2</i>
IHIT19361	IMT18579	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>blaCTX-M-Gruppe 9</i>
IHIT24950	4/12	<i>E. aerogenes</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>blaCTX-M-Gruppe 8</i>
IHIT24951	VW823	<i>E. coli</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>blaCTX-M-Gruppe 26</i>
IHIT19690	IMT21244	<i>Citrobacter freundii</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>QMY</sub></i>
IHIT19689	IMT21243	<i>Morganella morganii</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>DHA</sub></i>
IHIT19687	IMT21241	<i>Hafnia alvei</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>ACC</sub></i>
IHIT23979	β-12	<i>E. coli</i>	BR, Berlin; Dr. B. Guerra	<i>bla<sub>MOX</sub></i>
IHIT23977	β-2	<i>E. coli</i>	BR, Berlin; Dr. B. Guerra	<i>bla<sub>EBC</sub></i>
IHIT23978	β-9	<i>E. coli</i>	BR, Berlin; Dr. B. Guerra	<i>bla<sub>OX</sub></i>
IHIT19370	IMT20752	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>bla<sub>OXa-2</sub></i>
IHIT23980	β-17	<i>E. coli</i>	BR, Berlin; Dr. B. Guerra	<i>bla<sub>OXa-10</sub></i>
IHIT31509	IMT21500	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>bla<sub>OXa-1</sub></i>
IHIT31510	IMT17901	<i>K. pneumoniae</i>	IMT, Berlin	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
IHIT31511	IMT17421	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>bla<sub>TEM</sub></i>
IHIT31512	IMT18572	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>blaCTX-M-1</i>
IHIT19225	229/09	<i>K. pneumoniae</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>OXa-48-like</sub></i>
IHIT19222	234/11	<i>K. pneumoniae</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>KPC</sub></i>

Fortsetzung Tabelle 47

Eigene Nr.	Originalnummer	Spezies	Herkunft	Kontrolle für den Nachweis von
IHIT19223	188/11	<i>K. pneumoniae</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>VIM</sub></i>
IHIT22760	2/10	<i>E. coli</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>NDM</sub></i>
IHIT24947	180/12	<i>A. baumannii</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>PER</sub></i>
IHIT24948	15D	<i>P. aeruginosa</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>GES</sub></i>
IHIT25442	58K	<i>A. baumannii</i>	RKI, Wernigerode; Dr. Y. Pfeifer	<i>bla<sub>VEB</sub></i>

IMT: Institut für Mikrobiologie und Tiersuchen; BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung; RKI: Robert Koch-Institut

Tabelle 48: Verwendete Kontrollstämme für die PCRs zur Untersuchung auf virulenzassoziierte Gene

Eigene Nr.	Originalnr.	Spezies	Herkunft	Referenz für
x-0281/99	<i>E. coli</i> B41	<i>E. coli</i>	Wray C., Central Veterinary Laboratory	<i>f41, f5, estap</i>
x-0273/99	<i>E. coli</i> Abbotstown	<i>E. coli</i>	Wray C., Central Veterinary Laboratory	<i>f4, f6, elt, estap, estb, f41</i>
x-0279/99	<i>E. coli</i> E57	<i>E. coli</i>	Wray C., Central Veterinary Laboratory	<i>stx2, f18, estap, estb</i>
x-0276/99	<i>E. coli</i> TTP-1	<i>E. coli</i>	Helge Karch, Hamburg	<i>stx2, eae</i>
x-564/04	<i>E. coli</i> 612/99	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>cnf1/2, f17A, iucD</i>
x-265/99	<i>E. coli</i> J96	<i>E. coli</i>	Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Dr. Dobrindt	<i>cnf1/2, papC</i>
x-671/99	<i>E. coli</i> EDL933	<i>E. coli</i>	ATCC, Manassas, Virginia	<i>stx2, stx1, eae</i>
IHIT19343	IMT7920	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>kpsMTII, fimC, afad/traBC, sfafoc, Rpai (malX)</i>
IHIT19346	IMT9267	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>kpsMTII, hlyA, plc, fimC, hrfA/hex, neuC, sfafoc, Rpai (malX)</i>
IHIT19338	IMT2470	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>chuA, ibeA, traT, sitD (chr.), gimB, iron, ompA, sitD (epis.), astA, iss, irp2, papC, colV, iucD, tsh, vat, hlyF, pks, ompT</i>
IHIT19342	IMT7879	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>csgA, cnf1/2, fyuA, mat, feoB</i>
IHIT31513	IMT9260	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>ireA, tia, sat, fyuA, mat, feoB</i>
IHIT19341	IMT6609	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>stx1, escv, bfp</i>
IHIT19344	IMT8206	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>stx1, stx2, escv</i>
IHIT19337	IMT2352	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>iutA, gafD, papEF, bmaE, papGII, III</i>
IHIT19345	IMT9096	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>iutA, focG, papAH, sfas, papEF, hlyC, papGII, III, puva, yqi, iha</i>
IHIT19350	IMT25378	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>rfaE</i>

Fortsetzung Tabelle 48

Eigene Nr.	Originalnr.	Spezies	Herkunft	Referenz für
IHIT19339	IMT4529	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>csgA</i>
IHIT31514	IMT2104	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	<i>eitA</i> , <i>eitC</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>siA</i> , <i>cvaC</i>
IHIT: Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten; IMT: Institut für Mikrobiologie und Tiersuchen; ATCC: American Type Culture Collection				

Tabelle 49: Überblick über verwendete Kontrollstämme phänotypischer und funktioneller Tests und sonstiger in dieser Arbeit verwendeten Stämme

Eigene Nummer	Originalnummer	Spezies	Herkunft	Kontrolle für
IHIT19221	ATCC25992	<i>E. coli</i>	ATCC, Rockville, Maryland	Negativkontrolle für confirmatory test
IHIT30988	ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	ATCC, Rockville, Maryland	Positivkontrolle für ESBL-Screening und confirmatory test
IHIT30990	ATCC BAA-1705	<i>K. pneumoniae</i>	ATCC, Rockville, Maryland	Positivkontrolle für Carapenemase-Screening und MHT
IHIT30989	ATCC BAA-1706	<i>K. pneumoniae</i>	ATCC, Rockville, Maryland	Positivkontrolle für MHT
IHIT24620	AAEC189	<i>E. coli</i>	[410]	Negativkontrolle für Biofilm-Assays und Langzeitkolonien
IHIT24619	W3110	<i>E. coli</i>	Institut für Biologie, Humboldt-Universität Berlin, Prof. Hengge	Positivkontrolle für Biofilm-Assay (LB-Medium) und Langzeitkolonien
IHIT26347	IMT12041	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	Positivkontrolle für Biofilm-Assay (M63-Medium)
IHIT24594	IMT26949	<i>E. coli</i>	IMT, Berlin	Positivkontrolle für Langzeitkolonien
IHIT19352	IMT20859; J53	<i>E. coli</i>	RKI, Wernigerode	Rezipientenstamm Transkonjugationsversuch
IHIT22759	-	<i>S. Braenderup</i>	RKI, Wernigerode	Markerstamm für S1-Nuclease-Verdau
IHIT31515	R27	<i>E. coli</i>	(ehemals) BgVV Wernigerode	Referenzstamm Plasmidpräparation
IHIT31516	R478	<i>E. coli</i>	(ehemals) BgVV Wernigerode	Referenzstamm Plasmidpräparation
IHIT31517	Stm	<i>S. Typhimurium</i>	BfR, Berlin	Referenzstamm Plasmidpräparation
IHIT31518	x-0109/97	<i>E. coli</i>	Dr. Hermann Willems, Gießen	Referenzstamm Plasmidpräparation
IHIT31519	x-0001/98	<i>E. coli</i>	Prof. Dr. Stefan Schwarz, FLI Neustadt am Rübenberge	Referenzstamm Plasmidpräparation

IHIT: Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten; IMT: Institut für Mikrobiologie und Tiersuchen; ATCC: American Type Culture Collection; BfR: Bundsamt für Risikobewertung; RKI: Robert Koch-Institut

Tabelle 50: Übersicht über die Empfindlichkeitsprüfung der OXA-48-bildenden *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate mittels VITEK2-System

IHT-Nummer	Ampicillin	Amoxicillin- Clavulansäure <sup>1</sup>	Piperacillin	Cefalexin	Cefpodoxim	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Enrofloxacin	Marbofloxacin	Tetracyclin	Nitrofurantoin	Chloramphenicol	Polymyxin B	Trimethoprim- Sulfamethoxazol <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	22060	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≤1	≤1	8	≥16	8	≥4	≥8	≥16	≤16	≥64	1	≥320
	22062	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≤1	≤1	16	≥16	≥16	≥4	≥8	≥16	≤16	≥64	≤0,25	≥320
	22064	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	≤1	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	≤16	4	0,5	≥320
	22714	≥32	≥128	16	1	≥8	≤1	≤1	≤2	≤0,5	≤1	≥4	≥4	≥16	≤16	≥64	0,25	≤20
	22718	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≤1	≤1	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≥16	≤16	32	0,5	≥320
	22059	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	8	≥16	≥16	≥4	4	≤1	64	4	1	≥320
	22061	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	8	≥16	≥16	≥4	4	≤1	64	4	1	≥320
	22063	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	≤2	≥16	≥16	≥4	4	≤1	64	4	0,5	≥320
<i>K. pneumoniae</i>	22065	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≥64	≥16	4	≥16	≥16	≥4	≥4	4	256	4	1	≥320
	22066	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	4	≥16	≥16	≥4	≥4	≤1	64	1	1	≥320
	22721	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≥64	≥16	8	≥16	≥16	≥4	≥4	2	256	8	1	≥320
	22715	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≥320
	22719	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	4	4	≥16	≥16	≥4	≥4	2	64	4	1	≥320
	22720	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	4	≤1	≥16	≥4	≥4	2	64	8	1	≥320
	22722	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	≥64	≥16	≤2	≥16	≥16	≥4	≥4	2	256	8	1	≥320
	22723	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	4	8	≥16	≥16	≥4	≥4	≥16	64	≥64	1	≥320
	22716	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	8	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≤20
	22717	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	≤1	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	64	≥64	1	40
	23256	≥32	≥128	8	≤0,25	4	1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	0,5	≤20
	24181	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20
	24183	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20
	23257	≥32	≥128	≥64	≥8	4	≤1	≤1	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≤20
	24182	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	8	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	0,5	≤20
	24184	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	8	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20
	24178	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	≤1	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≤20
	24185	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	8	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20



Fortsetzung Tabelle 50

IHT-Nummer	Ampicillin	Amoxicillin- Clavulansäure <sup>1</sup>	Piperacillin	Cefalexin	Cefpodoxim	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Enrofloxacin	Marbofloxacin	Tetracyclin	Nitrofurantoin	Chloramphenicol	Polymyxin B	Trimethoprim- Sulfamethoxazol <sup>2</sup>
24187	≥32	≥32	≥128	8	≤0,25	4	≤1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	4	1	≤20
24179	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≤20
24188	≥32	≥32	≥128	8	≤0,25	≥8	≤1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	64	4	1	≤20
24171	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	4	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	64	4	0,5	≤20
24170	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	4	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	64	4	1	≤20
24172	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20
24175	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	≤1	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	160
24177	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	40
25322	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	16	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	32	≤2	1	≤20
25323	≥32	≥32	≥128	≥64	4	≥8	2	4	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	256	≥64	1	≤20
25324	≥32	≥32	≥128	≥64	4	≥8	2	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	256	≥64	0,5	≤20
25327	≥32	≥32	≥128	≥64	4	≥8	2	2	≤2	≤1	8	≥4	≥4	≥16	≥512	≥64	1	≤20
25328	≥32	≥32	≥128	≥64	≤0,25	≥8	≤1	4	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≤1	32	≤2	1	≤20
K. oxytoca	≥32	≥32	≥128	≥64	≥8	≥8	4	8	≤2	≤1	≤1	≥4	≥4	≥16	64	≥64		≥320

1: Das Verhältnis von Amoxicillin zu Clavulansäure betrug 2:1.

2: Das Verhältnis von Trimethoprim zu Sulfamethoxazol betrug 1:19.

## X Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundgerüst der einzelnen $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Gruppen .....	3
Abbildung 2: Sequenz der AmpC-Promotor-Region des <i>E. coli</i> K-12 [234].....	37
Abbildung 3: Quadruplex-PCR-Profile der Phylo-Typisierungsmethode modifiziert nach [134].....	42
Abbildung 4: ESBL-bildende (n=280) und AmpC-verdächtige (n=38) <i>E. coli</i> -Isolate, verteilt nach Tierarten .....	53
Abbildung 5: ESBL-bildende (n=280) und AmpC-verdächtige (n=38) <i>E. coli</i> -Isolate, verteilt nach ihrer klinischen Herkunft .....	54
Abbildung 6: Verteilung ESBL-bildender (n=44) und AmpC-verdächtiger (n=10) <i>K. pneumoniae</i> -Isolate, verteilt nach Tierarten .....	55
Abbildung 7: Verteilung ESBL-bildender (n=44) und AmpC-verdächtiger (n=10) <i>K. pneumoniae</i> -Isolate, verteilt nach klinischer Herkunft.....	56
Abbildung 8: Verteilung der ESBL-/AmpC-Typen bei <i>E. coli</i> .....	58
Abbildung 9: ESBL-/AmpC-Typen bei <i>K. pneumoniae</i> .....	61
Abbildung 10: PMQR-Gene bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen <i>E. coli</i> -Isolaten.....	64
Abbildung 11: PMQR-Gene bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten .....	65
Abbildung 12: Verteilung der phylogenetischen Gruppen bei phänotypisch bestätigten ESBL-bildenden und AmpC-verdächtigen <i>E. coli</i> .....	68
Abbildung 13: Durchschnittlicher Nachweis von VAGs aus unterschiedlichen Kategorien bei Ecor B2-, D- und F-E. coli-Isolaten.....	70
Abbildung 14: Verteilung der Sequenztypen bei <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten.....	74
Abbildung 15: Dendogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile der OXA-48-bildenden <i>E. coli</i> -Isolate .....	89
Abbildung 16: Dendogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile der OXA-48- bildenden <i>K. pneumoniae</i> -Isolate.....	90
Abbildung 17: S1-Nuclease-Verdau von sieben OXA-48-positiven WT und deren TK Bild: Dr. Yvonne Pfeifer, RKI Wernigerode.....	93
Abbildungen 18 a-e: Boxplots für die spezifische Biofilmbildung (SBF) von OXA-48-Plasmid-tragenden Wildtypen, Plasmid-gecurten Varianten, Transkonjuganten und des <i>E. coli</i> J53 im LB-Medium bei unterschiedlichen Inkubationszeiten .....	96
Abbildungen 19 a-e: Boxplots für die spezifische Biofilmbildung (SBF) von OXA-48-Plasmid-tragenden Wildtypen, Plasmid-gecurten Varianten , Transkonjuganten und des <i>E. coli</i> J53 im M63-Medium bei unterschiedlichen Inkubationszeiten .....	97
Abbildung 20: Darstellung der Wachstumsformen auf Spanagar (A) und Übersicht über die Formen des Wachstums eigener Isolate auf Spanagar (Auswahl) .....	99
Abbildung 21: Zeitstrahl zu dem Vorkommen der OXA-48-bildenden <i>Klebsiella</i> spp.- (n=36) und <i>E. coli</i> -Isolate (n=5).....	123

# XI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikationsschema für bakterielle $\beta$ -Laktamasen, modifiziert nach Bush und Jacoby [42]	7
Tabelle 2: Bisherige Nachweise von Carbapenemase-Genen bei Tieren	17
Tabelle 3: Verwendete Computerprogramme	28
Tabelle 4: Verwendete Antibiotika und Standards zur Interpretation	31
Tabelle 5: Überblick über die auf der Testkarte AST-GN38 vorhandenen Antibiotika, deren Konzentrationsbereiche und Interpretationsstandards	32
Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Monoplex-PCRs	34
Tabelle 7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Multiplex-PCRs	34
Tabelle 8: Angaben zu den Annealing-Temperaturen und der Anzahl der Zyklen der Mono- und Multiplex-PCRs	35
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die <i>aac(6')</i> -Ib-PCR	36
Tabelle 10: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Multiplex-PCRs I-IX (Tabelle 44)	38
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bosworth-PCR modifiziert nach Barth et al. [236]	39
Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der PCR zum Nachweis von VAGs bei <i>E. coli</i> -Isolaten von Rindern modifiziert nach van Bost, Franck und Nguyen [237-239]	40
Tabelle 13: Ansatz Mastermix für die <i>E. coli</i> - und <i>K. pneumoniae</i> -MLST	41
Tabelle 14: Mastermix Quadruplex-PCR zur Einteilung der <i>E. coli</i> -Isolate in phylogenetische Gruppen	42
Tabelle 15: Reaktionsansatz C- bzw. E-Detektions-PCR	43
Tabelle 16: Verteilung der im Zeitraum vom 04.06.2012 bis 04.06.2013 gesammelten <i>E. coli</i> Isolate (n=3582)	50
Tabelle 17: Verteilung der im Zeitraum 04.06.2012 bis 04.02.2014 gesammelten <i>K. pneumoniae</i> - und <i>K. oxytoca</i> -Isolate	51
Tabelle 18: Ergebnis der Empfindlichkeitsprüfung bei ESBL-bildenden/AmpC-verdächtigen <i>E. coli</i> - und <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten mittels Agardiffusionstest	57
Tabelle 19: ESBL-/AmpC-Typen bei <i>E. coli</i> , verteilt nach Tierarten	59
Tabelle 20: ESBL-/AmpC-Typen bei <i>E. coli</i> , verteilt nach klinischer Herkunft	60
Tabelle 21: ESBL-/AmpC-Typen bei <i>K. pneumoniae</i> , verteilt nach Tierarten	62
Tabelle 22: ESBL-/AmpC-Typen bei <i>K. pneumoniae</i> , verteilt nach klinischer Herkunft	62
Tabelle 23: Überblick über <i>E. coli</i> -Isolate mit Mutationen im <i>ampC</i> -Promotor, deren Position und die dadurch vermittelten Resistenzen gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika im Agardiffusionstest (s. 2.1.5.1)	63
Tabelle 24: Kombination von ESBL-/AmpC-Typen mit PMQR bei <i>E. coli</i>	66
Tabelle 25: Kombination von ESBL-/AmpC-Typen mit PMQR bei <i>K. pneumoniae</i>	66
Tabelle 26: Virulenzassoziierte Gene bei ESBL-/AmpC-bildenden <i>E. coli</i> aus dem Magen-Darm-Trakt von Schweinen und Rindern	67
Tabelle 27: Übersicht über die Herkunft der <i>EcoR</i> B2- und <i>EcoR</i> D-E. coli-Isolate, deren Sequenztypen und virulenzassoziierte Gene	71

Tabelle 28: Übersicht über Herkunft der <i>F</i> -ST648- <i>E. coli</i> -Isolate und deren virulenzassoziierte Gene 73	
Tabelle 29: Klinische Daten zu den Trägern von OXA-48-bildenden <i>E. coli</i> -Isolaten und Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung.....	76
Tabelle 30: Klinische Daten zu den Trägern OXA-48-bildender <i>Klebsiella spp.</i> -Isolate und Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung.....	78
Tabelle 31: Phänotypische und genotypische Charakteristika OXA-48-bildender <i>E. coli</i> -Isolate (chronologisch gelistet).....	83
Tabelle 32: Phänotypische und genotypische Charakteristika OXA-48-bildender <i>K. pneumoniae</i> -Isolate (chronologisch gelistet).....	84
Tabelle 33: Übersicht über alle vorhandenen OXA-48-TK und deren Resistenzen .....	92
Tabelle 34: Übersicht über die Isolate, von denen Transkonjugante und Plasmid-cured variants (PCV) generiert werden konnten.....	94
Tabelle 35: Übersicht über die Biofilmbildung der verschiedenen Varianten OXA-48-bildender <i>E. coli</i> - und <i>Klebsiella spp.</i> -Isolate (WT, TK, PCV) auf Spanagar.....	100
Tabelle 36: Übersicht über bisher veröffentlichte Studien zu dem Vorkommen von InPEC-ESBL/InPEC-AmpC.....	114
Tabelle 37: Verwendete Chemikalien.....	159
Tabelle 38: Verwendete Geräte und Softwareprogramme.....	161
Tabelle 39: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	162
Tabelle 40: Verwendete Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von ESBL-, AmpC-, Carbapenemase- und FQ-Resistenzgenen.....	167
Tabelle 41: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die <i>E. coli</i> - und <i>K. pneumoniae</i> -MLST .....	169
Tabelle 42: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die erweiterte Quadruplex-PCR nach Clermont und die Gruppe-C- bzw. Gruppe-E-Detektions-.....	170
Tabelle 43: Verwendete Oligonukleotid-Primer zum Nachweis konservierter Genregionen auf dem OXA-48-Plasmid.....	170
Tabelle 44: Verwendete Oligonukleotid-Primer Multiplex-PCR I-IX zum Nachweis virulenzassoziierten Gene bei <i>E. coli</i> .....	171
Tabelle 45: Verwendete Oligonukleotid-Primer Bosworth-PCR modifiziert nach Barth [236].....	175
Tabelle 46: PCR zum Nachweis virulenzassoziierten Gene bei <i>E. coli</i> -Isolaten von Rindern modifiziert nach van Bost, Franck und Nguyen .....	176
Tabelle 47: Verwendete Kontrollstämme für die PCRs zur Untersuchung auf Resistenzgene .....	177
Tabelle 48: Verwendete Kontrollstämme für die PCRs zur Untersuchung auf virulenzassoziierte Gene .....	178
Tabelle 49: Überblick über verwendete Kontrollstämme phänotypischer und funktioneller Tests und sonstiger in dieser Arbeit verwendeten Stämme.....	179
Tabelle 50: Übersicht über die Empfindlichkeitsprüfung der OXA-48-bildenden <i>E. coli</i> - und <i>Klebsiella spp.</i> -Isolate mittels VITEK2-System.....	180

# Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Christa Ewers danke ich für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich und meine Probleme und stand mir immer mit konstruktivem Rat und auch mit Tat zur Seite. Ich weiß, dass das nicht selbstverständlich ist.

Meiner Betreuerin Dr. Ellen Prenger-Berninghoff danke ich für ihre fachliche und auch moralische Unterstützung und das stets freundschaftliche Verhältnis, das alles so viel leichter gemacht hat. Ich habe mich immer sehr verstanden gefühlt. Danke auch für die tolle Einarbeitung in die Diagnostik- ohne die wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Dr. Katharina Kerner möchte ich dafür danken, dass sie jederzeit bereit war, große und kleine Brände zu löschen und auch nicht davor zurück schreckte, sich wegen mir mit unliebsamen Dingen wie SPSS zu beschäftigen. Sie war nicht nur einmal mein Retter in der Not!

Dr. Sandra Scheufen danke ich für das stetige Antreiben, die konstruktive Kritik, die vielen Denkanstöße und für die Begeisterung, die sie für meine Arbeit aufgebracht hat. Auch wenn sie in der Zwischenzeit andere Wege eingeschlagen hat, konnte ich mich weiter auf sie verlassen und jederzeit sicher sein, dass sie mir bei Problemen jeglicher Art mit Rat zur Seite steht.

Anja Schwanitz und Uschi Leidner danke ich für die exzellente Einarbeitung in die Methoden der Molekularbiologie, für die tatkräftige Unterstützung bei der doch ab und an nötigen Fehlersuche oder auch bei dem Berechnen von Konzentrationen. Es war eine schöne Zeit im S2!

Dr. Carsten Heydel möchte ich für die moralische Unterstützung bei der Bezwingung von BioNumerics® danken. Es tat gut, zu wissen, dass man nicht der einzige Mensch auf der Welt ist, dem dieses Programm (zumindest anfangs) ein Rätsel ist. Danken möchte ich ihm auch für die tolle Einarbeitung in die Rotation- das hat sicher dazu beigetragen, dass mir die Arbeit mit Studenten nach wie vor großen Spaß bereitet.

Allen Mitarbeitern der Diagnostik danke ich für die schönen Wochen, in denen ich sie unterstützen durfte und die mir immer eine schöne Abwechslung zu meiner Doktorarbeit waren. Welpe sein war toll!

Meinen Doktorandenkollegen danke ich für die schöne und lustige Zeit im Doktorandentrakt! Schön, euch alle kennengelernt zu haben. Besonders möchte ich meiner lieben Franzi danken, ohne die alles nur halb so schön und halb so erträglich gewesen wäre.

Dr. Yvonne Pfeifer vom Robert Koch-Institut in Wernigerode danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des S1-Nuclease-Verdaus und für das Zurverfügungstellen von Referenzstämmen.

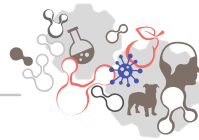
Dr. Ivonne Stamm von IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, danke ich für die anfängliche Unterstützung bei der Durchführung der MHK-Wert-Bestimmung und der Hilfe bei einigen Fragestellungen.

Der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der JLU Gießen und insbesondere Dr. Dirk Enderlein danke ich für das Zurverfügungstellen des Microplate Readers.

Am Ende möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken. Vor allem meiner Mutter, ohne die schon das Studium nicht möglich gewesen wäre und die es geschafft hat, dass trotz allem was aus mir wird. Und Tim, der in der ganzen Zeit vermutlich am meisten leiden musste, jede Nörgelei ertragen und in Kauf genommen hat, dass viele Wochenenden und Urlaubstage für die Doktorarbeit drauf gegangen sind. Bald ist es vorbei. ;-)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inka Stolle



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6559-1



9 78 3 835 9655 9 1